

**Titre:** Influence de la matière organique sur la spéciation de l'arsenic dans des sols synthétiques contaminés par l'arséniate de cuivre chromaté (CCA)  
**Title:**

**Auteur:** Simona Viorica Dobran  
**Author:**

**Date:** 2004

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Dobran, S. V. (2004). Influence de la matière organique sur la spéciation de l'arsenic dans des sols synthétiques contaminés par l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
**Citation:** <https://publications.polymtl.ca/7175/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7175/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de recherche:**  
**Advisors:**

**Programme:** Unspecified  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

INFLUENCE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE SUR LA SPÉCIATION DE  
L'ARSENIC DANS DES SOLS SYNTHÉTIQUES CONTAMINÉS PAR  
L'ARSÉNIATE DE CUIVRE CHROMATÉ (CCA)

SIMONA VIORICA DOBRAN  
DÉPARTEMENT DE GENIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)

Avril 2004



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-612-91937-4*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-612-91937-4*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

INFLUENCE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE SUR LA SPÉCIATION DE  
L'ARSENIC DANS DES SOLS SYNTHÉTIQUES CONTAMINÉS PAR  
L'ARSÉNIATE DE CUIVRE CHROMATÉ (CCA)

présenté par : DOBRAN Simona Viorica

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DUBOIS Charles, Ph.D., président

M. ZAGURY Gérald J., Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme DESCHÊNES Louise, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

Mme MILLETTE Louise, Ph.D., membre



## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement le professeur Gérald J. Zagury, mon directeur de recherche, pour ses nombreux conseils, son soutien, sa très grande disponibilité et aussi pour m'avoir communiqué le souci de rigueur.

J'exprime également ma profonde reconnaissance, à ma codirectrice de recherche, le professeur Louise Deschênes pour son appui, sa gentillesse et pour les conseils qu'elle m'a donnés tout au long du projet.

Mes remerciements vont également au professeur Réjean Samson qui m'a donné la possibilité d'étudier au sein de la Chaire Industrielle CRSNG en Assainissement et Gestion des sites du département de génie chimique.

Je voudrais remercier tout particulièrement Manon et Lucie pour leur précieuse aide et leur disponibilité durant la réalisation de la partie expérimentale de mon projet. Je remercie tous mes collègues pour le climat agréable pendant mon séjour à la Chaire. Un merci tout particulier à Catherine, Cécile et Laurence pour la correction préliminaire du français de mon mémoire.

Je tiens à remercier Calin, mon conjoint pour son soutien de tous les instants, mes filles Alexandra et Bianca, pour leur patience et leur compréhension, et ainsi que mes parents qui sont si loin, mais toujours si près.

## RÉSUMÉ

L'utilisation de l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) comme agent de préservation du bois représente une source potentielle de contamination des sols par l'arsenic (As), le cuivre (Cu) et dans une moindre mesure par le chrome (Cr). Ce type de contamination peut être présent dans les sols à la base des poteaux et structures en bois traités par du CCA, dans les sols retrouvés sur les sites d'imprégnation du bois, ou dans les sols contaminés par un déversement accidentel de CCA. De par sa forte toxicité et sa mobilité plus élevée dans les sols, l'arsenic représente le polluant le plus problématique parmi les trois éléments.

Malgré la reconnaissance grandissante par la communauté scientifique de l'importance de la spéciation des éléments chimiques, l'évaluation de l'impact de l'As dans le sol est toujours effectuée en se basant sur sa concentration totale. Cependant, la connaissance de la spéciation de l'As dans le sol est très importante puisque sa toxicité et sa mobilité sont étroitement liées à sa forme chimique. Ainsi, les formes chimiques de l'As les plus rencontrées dans le sol sont les formes inorganiques, soit l'As(V) (l'arséniate) et l'As(III) (l'arsénite). Les composés organiques méthylés, MMAA (acide d'arsenic monométhylé) et DMAA (acide d'arsenic diméthylé) sont présents en plus faibles concentrations. Il est reconnu que parmi les formes chimiques inorganiques de l'As, l'As(III) est plus toxique et potentiellement plus mobile dans le sol que l'As(V) et que les formes organiques méthylées, soit le MMAA et le DMAA sont moins toxiques.

La connaissance des facteurs influençant la formation de l'As(III) (plus toxique) et des composés méthylés dans le sol est primordiale afin de prévoir le devenir et la toxicité de l'As. Bien qu'en général, la forme prédominante de l'As dans les sols aérobies soit l'As(V), l'identification des facteurs de non équilibre qui pourraient mener à une augmentation de la proportion de l'As(III) dans le sol présente un intérêt particulier. Ainsi, dans les sols aérobies, la formation de l'As(III) pourrait avoir lieu par la réduction

de l'As(V) via un mécanisme biologique de detoxification (Macur *et al.*, 2001). Des travaux récents ont suggéré qu'un autre facteur susceptible de mener à la formation de l'As(III) dans le sol serait la matière organique qui peut favoriser une réduction de l'As(V) en As(III) (Balasoiu *et al.*, 2001; Redman *et al.*, 2002).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est d'évaluer en conditions aérobies, l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par du CCA sur la réduction de l'As(V) en As(III) et sur la formation des composés méthylés (MMAA et DMAA). À cette fin, des essais en macrocosmes en conditions aérobies ont été menés avec 4 sols synthétiques contaminés par du CCA ayant une teneur en matière organique variant de 0,5 % à 15 %. Dans le but de déterminer si la matière organique du sol influence la réduction de l'As(V) et la méthylation de l'As via l'activité microbienne, des sols inoculés avec une microflore en provenance d'un sol naturel (conditions biotiques) ont été étudiés parallèlement avec des sols non-inoculés (conditions abiotiques).

Les deux premières étapes du cadre expérimental ont été la constitution des sols synthétiques et leur contamination par une solution de CCA. Les 4 sols étaient constitués de kaolinite, de limon, de sable et de matière organique. Les teneurs en matière organique (M.O) des sols étaient les suivantes : sol A (0,5 % M.O.), sol B (5 % M.O.), sol C (7,5 % M.O.) et sol D (15 % M.O). Le choix de la source de matière organique des sols a été basé sur une caractérisation chimique de deux sources de matière organique envisagées, soit la tourbe et le fumier de volaille. Étant donné que les divers paramètres chimiques analysés ont indiqué un niveau de dégradabilité similaire pour les deux matériels, la source de matière organique des sols a été choisie en fonction du contenu en azote (plus précisément le rapport C/N), soit un mélange de tourbe et de fumier de volaille en proportion de 30%:70 % (p/p).

Les sols ont été contaminés à un pH autour de 6,4, avec une même concentration d'As pentavalent au moyen d'une solution commerciale de CCA de type C. Suite à une caractérisation physico-chimique des sols, les teneurs en matière organique (solides volatils) ont montré que les 4 sols s'inscrivaient dans la gamme des sols naturels que l'on pourrait retrouver à la base des poteaux et sur les sites d'imprégnation du bois par le CCA. Les sols avaient un pH autour de la neutralité (6,8-7). Il est ressorti également, que les concentrations de l'As dans les sols étaient élevées ( $600 \pm 18$  à  $722 \pm 34$  mg As/kg) et que la teneur en matière organique des sols n'influait pas la rétention de l'As. Les valeurs de la concentration de carbone organique dissous (COD) ont indiqué que les sols organiques (C et D) étaient similaires aux sols des horizons organiques des sols naturels, tandis que les sols moins organiques (A et B) étaient similaires à des sols minéraux.

Après la caractérisation des sols contaminés, des essais en macrocosmes ont été menés en conditions aérobies et non-saturées (80 % de la capacité de rétention d'eau au champ) sur les sols préalablement stérilisés par des radiations gamma. Une partie des sols (biotiques) a été inoculée avec une microflore en provenance d'un sol contaminé par l'As, le Cu et le Cr, échantillonné à la base d'un poteau traité par du CCA-C/PEG. Dans le cadre des essais en macrocosmes, les paramètres suivants ont été suivis après 1, 5, 15 et 40 jours d'incubation: la spéciation de l'As dans le sol (As(III), As(V)), la spéciation de l'As dans la fraction soluble (extraits aqueux) (As(III), As(V), MMAA et DMAA) et des paramètres liés à la dégradation de la matière organique du sol, soient le COD et le nombre d'hétérotrophes totaux et tolérants à l'As(V).

Après l'inoculation, l'évolution de la population des hétérotrophes totaux était similaire à celle des hétérotrophes tolérants à l'As(V) dans chaque sol. À la fin de la période d'incubation, le nombre d'hétérotrophes totaux et hétérotrophes tolérants à l'As(V) était semblable dans les sols, soit environ  $10^5$  et  $10^4$  unités formant des colonies (ufc)/g de résidu sec. Quant aux sols non inoculés, malgré les précautions prises, des hétérotrophes

totaux ont été dénombrés à partir du jour 5 dans les sols organiques B, C et D, et seulement au jour 40 dans le sol minéral A. Le nombre d'hétérotrophes totaux était à la fin de la période d'incubation comparable aux sols inoculés. En conséquence pour les sols B, C et D une distinction claire entre l'activité microbienne des sols inoculés et non-inoculés n'a pas pu être faite, la distinction étant possible seulement dans le cas du sol A. Pendant 40 jours, la concentration du carbone organique dissous (COD) a diminué dans les sols moins organiques A et B inoculés et non-inoculés, tandis qu'elle a augmenté dans les sols C et D inoculés et non inoculés. En accord avec l'augmentation du COD, il semble que pendant la période d'incubation, l'activité microbienne était plus intense dans les sols plus organiques C et D (inoculés et non inoculés) par rapport aux sols moins organiques A et B (inoculés et non inoculés).

Les résultats de la spéciation de l'As dans les sols (phase solide) ont montré qu'au jour 1 d'incubation la forme chimique de l'As prédominante dans les sols était l'As(V), mais l'As(III) était aussi présent dans les sols. Une teneur en matière organique des sols  $\geq 5$  % a entraîné une réduction de l'As(V) à l'As(III) dans le sol déjà avant les essais en macrocosmes, pendant la contamination des sols. Ainsi, au jour 1 d'incubation la proportion moyenne initiale d'As(III) dans les sols plus organiques B, C et D était comprise entre 5,4-6,8 % par rapport à 3 % dans le sol minéral A. Dans le temps, la proportion d'As(III) dans les sols moins organiques A et B a diminué probablement à cause d'une oxydation en As(V). En revanche, une teneur en matière organique du sol  $\geq 7,5$  % (sols C et D) a favorisé pendant 40 jours une augmentation de la proportion moyenne d'As(III) dans les sols d'environ 3 %. L'augmentation de l'As(III) dans les sols plus organiques ne s'est pas traduite par une diminution détectable de l'As(V) dans les sols probablement à cause des limites de la méthode d'analyse. Pendant la période d'incubation, la forme majoritaire de l'As dans tous les sols est toujours restée l'As(V), ce qui était conforme aux conditions redox du sol.

L'analyse de la spéciation de l'As dans la fraction soluble a montré que la teneur en matière organique n'a pas entraîné la réduction de l'As(V) soluble à l'As(III) ni la méthylation de l'As pendant 40 jours d'incubation aérobie. Pendant la période d'incubation, la forme chimique prédominante dans la fraction soluble est toujours restée l'As(V) (> 94%).

En revanche, un contenu plus élevé de matière organique entraînait une mobilisation de l'As (majoritairement sous forme d'As(V)). La proportion moyenne de l'As total soluble, au jour 1 d'incubation, était de 5,5 % dans le sol A par rapport à 14 % dans le sol organique D. Au jour 1 d'incubation, les concentrations d'As(III) et d'As(V) solubles étaient corrélées positivement avec la concentration initiale de COD du sol, mais n'étaient pas corrélées avec les concentrations totales d'As(III) et d'As(V) dans le sol. De plus, une augmentation significative de la teneur en matière organique dans le sol (de 7,5 % à 15 % ) influençait plus la solubilisation de l'As(III) que celle de l'As(V) dans le sol. À cet égard, la concentration d'As(III) soluble, au jour 1 d'incubation, était 5 fois plus élevée dans le sol le plus organique D par rapport au sol C, tandis que la concentration d'As(V) soluble dans le sol D était 2 fois plus élevée par rapport au sol C. À la lumière de ces résultats, on peut conclure que la concentration totale de l'As n'est pas un indicateur fiable pour la prédiction de la proportion de l'As total soluble et que le COD est un paramètre important dans la mobilisation de l'As dans le sol.

Dans le temps, la concentration d'As(V) soluble a diminué dans les sols moins organiques (A et B), tandis que dans les sols plus organiques (C et D) elle est restée stable. La stabilité de la concentration d'As(V) soluble pendant le temps dans les sols plus organiques C et D serait liée à une possible compétition dans la solution du sol entre l'As et les anions organiques (COD) pour les sites de rétention dans le sol. Quant à l'As(III) soluble, sa concentration a diminué pendant le temps dans les tous les sols (B,C et D), ce qui est conforme aux conditions redox aérobies. En présence des micro-

organismes inoculés, la teneur en matière organique a favorisé la diminution de l'As(III) soluble, probablement à cause d'une oxydation biologique.

En conclusion, il a été montré que dans le cas des sols aérobies contaminés par le CCA, l'augmentation de la teneur en matière organique ( $\geq 7,5 \%$ ) a entraîné une réduction de l'As(V) en As(III) dans la phase solide pendant 40 jours d'incubation. En revanche, la teneur en matière organique du sol n'a pas influencé la réduction de l'As(V) à l'As(III) ni la méthylation de l'As dans la fraction soluble. La teneur en matière organique du sol s'est avérée un facteur important dans la solubilisation de l'As (V) dans le sol. De plus, il semble qu'une augmentation significative de la teneur en matière organique du sol (de 7,5% à 15 %) a entraîné plus la solubilisation de l'As(III) que de l'As(V). Également, les sols plus organiques ( $\geq 7,5 \%$  M.O.) ont favorisé la stabilité de l'As(V) soluble pendant le temps. En conséquence, les sols aérobies contaminés par le CCA riches en matière organique seraient plus dangereux que les sols contaminés moins organiques. Le danger écotoxicologique des sols aérobies plus organiques ne serait pas lié à la présence de l'As(III) soluble (plus toxique) étant donné que sa proportion dans le sol diminue pendant le temps. Le danger serait plutôt lié à une proportion plus élevée d'As(V) soluble dans ces sols et aussi à une plus grande disponibilité de l'As(V) soluble pendant le temps.

## ABSTRACT

The use of chromated copper arsenate (CCA) as a wood preservative is a potential source of soil contamination with arsenic (As), copper (Cu) and in a lesser extent with chromium (Cr). This contamination can be found in soils around CCA treated domestic wood structures and wood poles, soils from wood preservation sites and soils contaminated by accidental spillage of CCA. Among those three elements, As is the most dangerous element due to its high toxicity and mobility in soils.

In spite of the growing recognition by the scientific community of the importance of chemical speciation, the evaluation of the impact of As contaminated soil is always carried out based on its total concentration. Knowledge of As speciation in soil is very significant since its toxicity and its mobility are closely related to its chemical form. In soils, the most often encountered arsenic species are inorganic, As(III) (arsenite) and As(V) (arsenate). The organic methylated species, like MMAA (monomethyl arsonic acid) and DMAA (dimethyl arsinic acid) are usually present in lower concentrations. It is well known that among the inorganic As species, As(III) is the most toxic and potentially most mobile in soil, while the methylated forms, MMAA and DMAA, are less toxic.

The understanding of factors affecting As(III), MMAA and DMAA formation in soil is of high interest in order to predict As behaviour and toxicity in soils. Although, the prevalent form of As in aerobic conditions is As(V), the identification of nonequilibrium factors which can lead to an increase in the proportion of As(III) is of particular interest. The reduction of As(V) to As(III) via detoxification in oxic soils may contribute to apparent nonequilibrium conditions (Macur *et al.*, 2001). Also, soil organic matter content is suspected to be another important factor in soil that can lead to As(III) formation (Balasoïu *et al.*, 2001; Redman *et al.*, 2002).



Therefore, the objective of this study was to investigate the role of organic matter content of soil contaminated with CCA on the reduction of As(V) to As(III), and on As methylation, under aerobic conditions. In order to evaluate this influence, a macrocosms experiment was conducted for 40 days, with four artificial CCA contaminated soils, in which organic matter content varied between 0.5% and 15%. With the aim of determining if organic matter influences the reduction of As(V) and As methylation via microbial activity, inoculated soils (biotic conditions) were studied in parallel with non-inoculated soils (abiotic conditions).

The first two steps of experimentation consisted of a synthesis and a contamination of four soils (A, B, C, D) with commercial CCA-C solution. The four artificial soils were made up of kaolinite, silt, sand and organic matter. The organic matter (M.O) content of the soils was: soil A (0.5 % M.O.), soil B (5 % M.O.), soil C (7.5 % M.O.), soil D (15 %M.O). The choice of soils organic matter, was based on a chemical characterization of two sources of organic matter, peat and chicken manure. Because the chemical properties indicated similar degradability potential for both of the organic materials, the source of organic matter in the soils was chosen based on the nitrogen content of the two organic materials or more precisely the C/N ratio, as a mixture of sphagnum peat moss and composted chicken manure in the proportion of 30 %: 70 % (p/p).

The soils were contaminated at pH=6.4, with the same concentrations of As(V), by means of CCA type C commercial solution. The soil characterization revealed an alkaline pH (6.8-7) and a high total concentration of As ( $600 \pm 18$  to  $722 \pm 34$  mg As/kg). Also, the content of organic matter did not influence the retention of As in soils. According to organic matter content, the four artificial soils were similar to surface natural soils that can be encountered in soils around CCA treated wood poles and in soils from wood preservation sites. The dissolved organic carbon (DOC) concentrations suggested that the more organic soils (C and D) were similar to the soils of the natural

organic horizons, while the less organic soils (A and B) were similar to the horizons of mineral soils.

After the contaminated soils characterisation, a macrocosms study was performed under aerobic and unsaturated conditions (80 % of field capacity) with the soils initially sterilised by gamma irradiation. The soils were inoculated with an indigenous microflora isolated from a CCA contaminated field soil collected from the surface immediately adjacent to a CCA/PEG treated pole. During the macrocosms study, the following parameters were analysed after 1, 5, 15, and 40 days of incubation: As speciation in soil (As(III), As(V)), As speciation in soil water extracts (As(III), As(V), MMAA et DMAA), and parameters linked with the degradation of organic matter, such as DOC, heterotrophic bacteria, and resistant-As(V) bacteria.

After the inoculation, the evolution of the population of the total heterotrophic and As(V)-resistant bacteria was similar in each soil. After 40 days, the number of total heterotrophic and As(V)-resistant bacteria was approximately  $10^5$  and  $10^4$  colony forming units (cfu)/g dry soil. Concerning the non-inoculated soils, despite all precautions, total heterotrophic bacteria were found after 5 days in organics soils (B, C, D) and at day 40 in mineral soil (A). After 40 days, total heterotrophic bacteria were comparable with their number in inoculated soils. Consequently, a clear distinction between microbial activity in the inoculated and non-inoculated organic soils (B, C, D) could not be made, the distinction being possible only in the case of soil A. Over 40 days, the concentration of DOC decreased in the less organic soils, A and B (inoculated and non-inoculated), while increased in the more organic soils, C and D (inoculated and non inoculated). Due to augmentation of the concentration of DOC, it is likely that the microbial activity was more intense in the more organic soils (C and D) compared to the less organic soils (A and B).

The results of As speciation in soils revealed that on the first day of incubation, As(V) was the main form of As in the soil, but As(III) was also present. It appears that a content of O.M. in soils  $\geq 5\%$  determined the reduction of As(V) to As(III) already before the incubation experiments, during the soils contamination. The average proportion of As(III) in organic soils B, C and D ( $\geq 5\%$  O.M.) was 5.4-6.8 % while in mineral soil A it was 3 %. However, the As(III) proportion in less organic soils A and B decreased with time, probably due to an oxidation to As(V), which would be in conformity with the redox conditions. On the other hand, the soil content of organic matter  $\geq 7.5\%$  (soils C and D) determined over 40 days, an increase in the As(III) proportion of about 3 %. The increase of As(III) concentrations in soils was not translated by a reduction in As(V) concentrations, due probably to the limit of analytical methods. During the 40 days incubation, the main As form in all soils was As(V), according to redox conditions.

The speciation analyses of soil extracts showed that soil organic matter content influenced neither the reduction of As(V) to As(III), nor As methylation in the soluble fraction, during the 40 day incubation. During incubation, the prevalent chemical form of As in the soluble fraction was As(V) ( $> 94\%$ ) which was in agreement with the redox conditions.

Moreover, the high content of organic matter determined on the first day of incubation the increase of the proportion of soluble As (mainly as As(V)), varying between 5.5 % in mineral soil A to 14 % in organic soil D. At first day of incubation the soluble concentrations of As (III) and As(V) were positively correlated with the initial concentration of DOC of soils, but were not correlated with the total concentrations of As(III) and As(V) in soils. Also, it seems that a significant increase in organic matter content in the soil, varying between 7.5 % to 15 %, influenced the As(III) solubilization more than of As(V). The As(III) soluble concentration at first day of incubation was 5 times higher in highly organic soil D compared to soil C, while the As(V) soluble

concentration in soil D was 2 times higher compared than to soil C. Thus, the total concentration of As was not a reliable indicator for the prediction of the proportion of soluble As in soil and the DOC played a significant role in As mobility in soil.

However, with time, soluble concentration of As(V) decreased in the less organic soils (A and B), while in the highly organic soils (C and D) it remained stable. The stability of the soluble concentration of As(V) during time in the highly organic soil would be presumably be linked to the possible competition in the soil solution between As and the organic anions (DOC) for the retention sites in the soil. The soluble concentrations of As(III) decreased during time in the all soils (B,C and D), which would be in conformity with the aerobic redox conditions. In the presence of the inoculated bacteria, the content of organic matter accelerated the reduction of soluble As(III) in soil, probably due to a biological oxidation.

In conclusion, the results of this study revealed that the increase of organic matter content in CCA contaminated soils ( $\geq 7.5$  %) under aerobic conditions influenced the As(V) reduction to As(III) in the solid phase, while the content of organic matter did not influence the As(V) reduction and As methylation in the soluble fraction. The organic matter content appeared to be an important factor that increased As(V) solubility in soils. Also, a significant increase of organic matter content (7.5 % at 15 %) appeared to be an factor that influenced the As(III) solubilization more than of As(V). In addition, the increase of organic matter content ( $\geq 7.5$  %) was a factor that promoted the availability of As (V) in soil over time.

The CCA contaminated soils rich in organic matter seem to be more dangerous compared to the less organic soils. The ecotoxicological danger of the CCA-contaminated highly organic and oxic soils seems to be related to the an increase in soluble As(V) and its availability over time rather than to the presence of As(III), the most toxic form of arsenic.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIX</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XX</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>XXI</b>
<b>CHAPITRE I.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 PROBLÉMATIQUE ET CONTEXTE DE L'ÉTUDE .....	1
1.2 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS .....	5
1.3 ORGANISATION DU MÉMOIRE .....	6
<b>CHAPITRE II.....</b>	<b>7</b>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>7</b>
2.1 SOLS CONTAMINÉS AU CCA .....	7
2.1.1 Problématique de la contamination des sols au CCA.....	7
2.1.2 Propriétés de l'As dans les sols contaminés par le CCA.....	8
2.2 SPÉCIATION DE L'AS DANS LE SOL .....	10
2.2.1 Facteurs influençant la spéciation de l'As dans le sol.....	12
2.2.1.1 Facteurs abiotiques .....	12
2.2.1.1.1 pH et potentiel d'oxydoréduction (Eh).....	12
2.2.1.1.2 Minéralogie du sol.....	17
2.2.1.1.3 Matière organique .....	18
2.2.1.2 Facteurs biotiques.....	19
2.2.1.2.1 Oxydation biologique de l'As(III) .....	20
2.2.1.2.2 Réduction biologique de l'As (V).....	22
2.2.1.2.3 Méthylation/déméthylation de l'As.....	25

2.3	TOXICITÉ DE L'ARSENIC.....	28
2.4	SOLUBILITÉ ET BIODISPONIBILITÉ DE L'AS DANS LE SOL.....	31
2.4.1	Concept de biodisponibilité .....	31
2.4.2	Facteurs influençant la solubilité et la biodisponibilité de l'As dans le sol.....	32
2.4.2.1	Adsorption de l'As dans le sol .....	33
2.4.2.1.1	pH.....	33
2.4.2.1.2	Potentiel redox (Eh) .....	35
2.4.2.1.3	Force ionique .....	35
2.4.2.1.4	Ions compétitifs.....	35
2.4.2.1.5	Matière organique .....	37
2.4.2.2	Précipitation de l'As dans le sol.....	39
2.4.2.3	Activité microbienne .....	39
<b>CHAPITRE III</b>	<b>.....</b>	<b>41</b>
<b>CONSTITUTION ET CONTAMINATION DE SOLS SYNTHÉTIQUES PAR UNE SOLUTION DE CCA.....</b>		<b>41</b>
3.1	INTRODUCTION.....	41
3.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	44
3.2.1	Constitution des sols synthétiques.....	44
3.2.2	Caractérisation de la matière organique .....	45
3.2.3	Contamination des sols synthétiques.....	49
3.2.4	Caractérisation physico-chimique des sols synthétiques.....	50
3.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	51
3.3.1	Caractérisation de la matière organique .....	51
3.3.2	Caractérisation physico-chimique des sols synthétiques.....	55
<b>CHAPITRE IV</b>	<b>.....</b>	<b>59</b>
<b>INFLUENCE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE SUR LA SPÉCIATION DE L'AS DANS LE SOL.....</b>		<b>59</b>
4.1	INTRODUCTION.....	59
4.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	60

4.2.1 Extraction de la microflore d'un sol naturel contaminé par l'As.....	60
4.2.2 Essais en macrocosmes.....	61
4.2.3 Caractérisation physico-chimique.....	63
4.2.4 Caractérisation microbiologique.....	67
4.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	69
4.3.1 Caractérisation physico-chimique initiale des sols.....	69
4.3.2 Caractérisation microbiologique des sols.....	73
4.3.3 Carbone organique dissous (COD).....	76
4.3.4 Spéciation de l'As dans les sols.....	78
4.3.5 Spéciation de l'As dans les extraits aqueux.....	86
<b>CHAPITRE V.....</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>98</b>
5.1 CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....	98
5.2 RECOMMANDATIONS .....	100
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>102</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>119</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Formulations de l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) (% p/p) .....	7
Tableau 3.1 Composition des sols synthétiques.....	45
Tableau 3.2 Propriétés chimiques de la tourbe et du fumier de poulet .....	54
Tableau 3.3 Paramètres physico-chimiques des sols non contaminés (NC) et contaminés (C) .....	56
Tableau 3.4 Pourcentage de métaux retenus (après la digestion totale des sols).....	56
Tableau 4.1 Caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'échantillon de sol naturel prélevé en surface à proximité d'un poteau traité au CCA.....	60
Tableau 4.2 Conditions d'opération du HPLC.....	67
Tableau 4.3 Caractéristiques physico-chimiques des sols au jour 1 d'incubation.....	70
Tableau 4.4 Hétérotrophes totaux dans les sols inoculés (ufc/g sol sec) en fonction du temps d'incubation.....	75
Tableau 4.5 Hétérotrophes tolérants à l'As(V) dans les sols inoculés (ufc/g sol sec) en fonction du temps d'incubation .....	75
Tableau 4.6 Hétérotrophes totaux des sols non-inoculés (NI) (ufc/g sol sec) en fonction du temps d'incubation .....	76
Tableau 4.7 Concentrations COD (g/kg sol) en fonction du temps d'incubation.....	77
Tableau 4.8 Concentrations d'As total des sols (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation .....	79
Tableau 4.9 Spéciation de l'As dans les sols (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation .....	82
Tableau 4.10 Proportion d'As(III) (%) en fonction du temps d'incubation .....	83
Tableau 4.11 Concentrations As total soluble (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation.....	87
Tableau 4.12 Spéciation de l'As dans les extraits aqueux (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation .....	91



## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Stabilité des formes chimiques de l'As (298 K, 100 kPa, $10^{-4}M$ ) (Moore <i>et al.</i> , 2000).....	13
Figure 2.2 Stabilité des formes chimiques de l'As (298 K, 1 bar) (Sadiq, 1997).....	13
Figure 3.1 Plan expérimental du projet.....	43
Figure 4.1 Hétérotrophes totaux en fonction du temps d'incubation.....	73
Figure 4.2 Hétérotrophes tolérants à l'As(V) en fonction du temps d'incubation.....	74

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A : Protocoles expérimentaux. Constitution des sols synthétiques et contamination par du CCA. ....	119
Protocole P54-A : Constitution des sols synthétiques .....	120
Protocole 35-A : Récupération du limon à partir d'un sol de base .....	123
Protocole A7 : Détermination du poids sec d'un sol .....	126
Protocole 35-G : Augmentation du pH d'un sol synthétique.....	130
Protocole P35-H: Contamination artificielle d'un sol synthétique avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté (CCA).....	133
ANNEXE B : Protocoles expérimentaux. Caractérisation de la matière organique. ....	140
Protocole P54-B : Détermination de paramètres chimiques de la tourbe et du fumier de poulet, source de matière organique dans la constitution des sols synthétiques. ....	141
Protocole P33-A : Détermination de la matière organique dans un résidu minier par combustion à 550 °C. ....	146
Protocole 35-D : Extraction alcaline de la tourbe de sphaigne : séparation en acides humiques et fulviques .....	149
Protocole P54-C : Détermination du carbone organique dissous (COD) d'un matériel organique et de l'absorptivité de masse spécifique (MSA) du COD .....	156
Protocole P54-D : Détermination des substances facilement disponibles (SFD) de la tourbe et du fumier de poulet composté.....	161
ANNEXE C : Protocoles expérimentaux. Essais en macrocosmes.....	167
Protocole APSO23 : Capacité de rétention d'eau au champ d'un échantillon de sol. ....	168
Protocole P54-E: Échantillonnage d'un sol contaminé par As pour fin d'extraction de la microflore du sol. ....	171
Protocole P54-F : Extraction d'une microflore d'un sol contaminé par l'As en vue de son inoculation dans un sol synthétique contaminé par du CCA .....	175
P54-I: Dénombrement de la population microbienne hétérotrophe tolérante à l'arsenic dans un sol contaminé par le CCA, par la méthode de décompte sur boîtes de pétri.	182

P54-J: Évaluation de l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) sur la spéciation de l'arsenic. Essais en macrocosmes.....	190
ANNEXE D : Résultats expérimentaux .....	200

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Problématique et contexte de l'étude

L'arsenic (As) est un élément semi-métallique, présent dans la croûte terrestre et à l'état de traces dans toute matière vivante. Il se retrouve naturellement dans l'environnement, résultant du vieillissement des roches qui en contiennent, de même que de l'activité volcanique. Lorsque les dépôts minéraux ou de roches se dissolvent, l'arsenic peut s'infiltrer et polluer de façon naturelle, les sols et les sources d'eau de surface et souterraines. À titre d'exemple, on peut mentionner la contamination d'origine géologique des eaux souterraines par l'arsenic au Bangladesh. Ainsi, une population de 60-100 millions d'habitants est soumise à l'empoisonnement involontaire par la consommation d'eau de puits contaminée par l'arsenic (Ng *et al.*, 2003). Par ailleurs, en raison du danger pour la santé humaine de l'ingestion de l'eau potable contenant de l'arsenic, l'USEPA, a décidé à partir d'octobre 2001, de diminuer sa concentration maximale admise dans l'eau potable de 50 µg/l à 10 µg/l (Zhang *et al.*, 2002).

Dans les sols non contaminés, la concentration moyenne de l'As, varie de 5 à 10 mg/kg (Herreweghe *et al.*, 2003). Son accumulation dans le sol est causée par certaines activités industrielles soient : l'industrie minière, les fonderies de métaux, l'incinération de déchets, la combustion de charbon, l'industrie pharmaceutique et l'industrie électronique. Une autre source importante de pollution du sol par l'As est son utilisation dans l'industrie de préservation du bois et dans l'agriculture sous forme de pesticides et herbicides (Turpeinen *et al.*, 2003). En effet, au cours des dernières décennies, l'agent de préservation du bois le plus utilisé était l'arséniate de cuivre chromaté de type C (CCA-C), contenant des oxydes dans la proportion suivante: 18,5 % CuO, 47,5 % CrO<sub>3</sub> et 34 % As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Cooper, 1994).

La problématique environnementale liée à l'utilisation du CCA est associée au potentiel de contamination du sol par les trois métaux, As, Cr et Cu. Ce type de contamination peut être rencontré dans les sols à la base des poteaux ou des structures en bois traités par du CCA, dans les sols retrouvés sur les sites d'imprégnation de bois, ou dans les sols contaminés par un déversement accidentel de CCA.

Des études ont montré que les composants du CCA tel qu'appliqués sur le bois sont mobilisables dans le sol (Stilwell et Gorny, 1997; Chirenje *et al.*, 2003 ; Zagury *et al.*, 2003). En général, la concentration des métaux retrouvés alors dans le sol à proximité de poteaux de bois traités en service et à la base des structures domestiques en bois suit l'ordre suivant :  $Cu > As > Cr$  (Stilwell et Gorny, 1997; Zagury *et al.*, 2003). Les études effectuées sur le potentiel de contamination du sol par les trois polluants ont montré que l'arsenic constitue le polluant le plus inquiétant en raison de sa forte toxicité et de son potentiel de mobilisation plus élevé dans le sol (Andersen *et al.*, 1996 ; Stilwell et Gorny, 1997; Turpeinen *et al.*, 2002 ; Zagury *et al.*, 2003). Ainsi, dans des conditions environnementales favorables, l'arsenic est susceptible de contaminer les récepteurs comme la végétation et les eaux souterraines.

Dans les sols contaminés, les formes chimiques de l'As les plus communes sont les formes inorganiques, soient l'As(V) (arséniate) et l'As(III) (arsénite), et parmi les composés méthylés, le MMAA (acide d'arsenic monométhylé) et le DMAA (acide d'arsenic diméthylé) (Pongratz, 1998 ; Smith *et al.*, 1999; Ruokolainen *et al.*, 2000 ; Turpeinen *et al.*, 2002). En général, l'évaluation du risque des sols contaminés par l'arsenic et le choix de la technologie de traitement des sols sont basés sur la concentration totale en As (Turpeinen *et al.*, 2003). Cependant, en vue d'évaluer l'impact environnemental potentiel d'un sol contaminé, la connaissance des concentrations des espèces chimiques de l'As est d'une importance fondamentale étant donné que la toxicité et la mobilité de l'As dans le sol sont liées à sa spéciation.

La forme chimique la plus dangereuse du point de vue environnemental est l'As(III) inorganique qui est la forme la plus toxique, la plus soluble et potentiellement la plus mobile dans le sol (Smith *et al.*, 1999). Les composés méthylés de l'arsenic sont moins toxiques et le mécanisme de méthylation serait dû exclusivement à l'activité microbienne du sol (Sadiq, 1997; Cullen et Reimer, 1998; Turpeinen *et al.*, 1999). On considère que la méthylation de l'As dans le sol est un mécanisme qui participe au cycle biochimique de l'arsenic (Pongratz, 1998), mais son importance *in situ* n'est pas encore connue.

Dans le sol, l'As se retrouve sous une forme adsorbée sur les particules de sol et sous une forme soluble contenue dans l'eau des pores. La solubilisation et la mobilisation de l'As dans le sol sont contrôlées par plusieurs facteurs qui interagissent, soient le pH, le potentiel d'oxydoréduction (Eh), et les phénomènes d'adsorption /désorption. Les études sur la spéciation de l'As dans les sols contaminés par le CCA sont peu nombreuses (Turpeinen *et al.*, 1999 ; Ruokolainen *et al.*, 2000 ; Balasoiu *et al.*, 2001; Turpeinen *et al.*, 2002). En général, les études ont montré que la spéciation de l'As dans la solution du sol est en rapport avec le diagramme thermodynamique Eh-pH à l'équilibre (Masscheleyn *et al.*, 1991; Onken et Hossner 1995; Ruokolainen, 2000). En conditions aérobies, la forme chimique prédominante est l'As(V), tandis qu'en conditions anaérobies, c'est l'As(III).

Cependant, une prédiction du rapport As(V)/As(III) dans la solution du sol, en conditions aérobies, basée seulement sur le diagramme d'équilibre Eh-pH, peut être fausse et des facteurs de non-équilibre pourraient augmenter la proportion d'As(III) dans le sol (Cullen et Reimer, 1989; Jones *et al.*, 1999 ; Macur *et al.*, 2001). Un facteur qui pourrait contribuer aux conditions de non-équilibre dans le sol, est le mécanisme de résistance des microorganismes à l'As (via la détoxification) par lequel la formation de l'As(III) a été observée dans les sols aérobies et à la surface des eaux (Macur *et al.*, 2001). Un autre facteur susceptible d'augmenter la proportion d'As(III) dans le sol est la

matière organique du sol (Balasoiu *et al.*, 2001 ; Redman *et al.*, 2002) qui peut favoriser une réduction de l'As(V) en As(III). Ainsi, l'étude de Balasoiu *et al.* (2001) a mis en évidence que la proportion d'As(III) retrouvée dans des sols synthétiques contaminés artificiellement par le CCA augmentait avec la teneur en matière organique. La matière organique, un composant redox important du sol, pourrait entraîner en conditions aérobies, la réduction abiotique de l'As(V) en As(III) par les substances humiques et fulviques qui sont d'importants réservoirs de donneurs d'électrons (Wittbrodt et Palmer, 1995 ; Redman *et al.*, 2002). La réduction biologique de l'As(V) en As(III) en conditions aérobies, serait attribuée à la présence de micro-organismes par un mécanisme de détoxification, ou par une augmentation de l'activité microbienne du sol par une consommation (oxydation) de la matière organique (Wittbrodt et Palmer, 1995 ; Kozuh et Gorenc, 2000; Macur *et al.*, 2001; Bolan *et al.*, 2003). On considère que la fraction de la matière organique susceptible d'être corrélée avec l'activité microbienne est le carbone organique dissous (COD). Cette fraction pourrait être impliquée dans la réduction biotique de l'As(V) en As(III) dans la solution du sol. De plus, le COD serait aussi un paramètre susceptible d'augmenter la mobilisation de l'As dans le sol (Kalbitz et Wennrich, 1998; Grafe *et al.*, 2001).

En conséquence, la matière organique est une composante du sol susceptible d'influencer la solubilité, la mobilité et la toxicité de l'As, par la modification de sa spéciation dans le sol. Toutefois, dans la littérature, le rôle de la matière organique du sol sur la spéciation de l'As et les mécanismes impliqués n'ont pas été encore élucidés. Dans ce contexte, il est nécessaire d'étudier l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par le CCA, sur la réduction de l'As (V) en As(III) et sur la méthylation de l'As. Ainsi, dans le présent travail, l'influence de la teneur en matière organique des sols contaminés par le CCA sur la spéciation de l'As sera étudiée sur 4 sols synthétiques contaminés artificiellement par une solution commerciale de CCA-C. Les résultats de cette étude pourront apporter une meilleure compréhension des

mécanismes qui contrôlent la spéciation de l'As et par conséquent, sa mobilité et sa toxicité dans les horizons du sol riches en matière organique.

## **1.2 Hypothèse de recherche et objectifs**

L'hypothèse de recherche sur laquelle se base le projet est la suivante :

- La teneur en matière organique d'un sol contaminé par le CCA influence la réduction de l'As (V) en As (III) et le processus de méthylation en conditions aérobies.

L'objectif principal de ce projet est le suivant :

- Evaluer en conditions aérobies, l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par le CCA sur la réduction de l'As (V) en As (III) et sur le processus de méthylation, tant en conditions abiotiques que biotiques.

Afin d'atteindre l'objectif principal, les sous-objectifs suivants ont été fixés :

- Choisir et caractériser la source de matière organique utilisée dans les sols synthétiques.
- Constituer et contaminer 4 sols synthétiques avec une solution commerciale de CCA de type C.
- Effectuer la caractérisation physico-chimique des sols contaminés par le CCA.
- Extraire une microflore à partir d'un sol contaminé par le CCA, prélevé à la base d'un poteau traité par du CCA-C/PEG.
- Effectuer des essais en macrocosmes, en conditions aérobies et non saturées, en vue d'évaluer l'influence de la teneur en matière organique du sol sur la réduction de l'As(V) en As(III) et sur la méthylation de l'As dans des conditions abiotiques et biotiques.



### **1.3 Organisation du mémoire**

Le présent mémoire comprend 5 chapitres. Le présent chapitre porte sur la problématique environnementale associée à la contamination des sols par l'As, en raison de l'utilisation du CCA. Le deuxième chapitre présente les éléments pertinents de la revue de littérature pour établir le cadre de recherche et pour la compréhension du contexte du projet. Le troisième chapitre traite la constitution des sols synthétiques, la contamination artificielle des sols par le CCA et la caractérisation physico-chimique des sols contaminés. Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus dans le cadre des essais en macrocosmes, réalisés pour évaluer l'influence de la teneur en matière organique sur la spéciation de l'As dans les sols contaminés par le CCA. Finalement, la conclusion générale et des recommandations sont présentées au chapitre 5.

## CHAPITRE II

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 2.1 Sols contaminés au CCA

##### 2.1.1 Problématique de la contamination des sols au CCA

L'arséniate de cuivre chromaté (CCA) est un agent inorganique de préservation du bois qui vise à augmenter la durée de vie des produits de bois en les protégeant contre les organismes susceptibles de le détériorer (les microorganismes et les insectes). Le CCA est un produit qui a dernièrement largement remplacé les produits de préservation du bois organiques, soit le pentachlorophénol (PCP) et la créosote, produits plus dispendieux et qui engendrent des préoccupations environnementales majeures (Hingston *et al.*, 2001). Le CCA est un mélange de 3 oxydes, soient l'oxyde d'arsenic (As), de chrome (Cr) et de cuivre (Cu). Plusieurs formulations de CCA ont été développées en fonction des proportions des oxydes de Cr, Cu et As retrouvées dans sa composition (voir le tableau 2.1) (Cooper, 1994). La formulation de CCA utilisée presque exclusivement en Amérique de Nord dans la dernière décennie, est le CCA de type C, qui assure une meilleure résistance des métaux au lessivage du bois traité, du à un meilleur rapport Cr/As (Cooper, 1994). Dans le CCA, le Cu joue le rôle de fongicide, l'As agit comme insecticide, tandis que le Cr est un agent de fixation du Cu et de l'As dans le bois (Chirenje *et al.*, 2003). L'As est présent dans la composition du CCA sous la forme pentavalente As(V) (Cooper, 1994; Cai et DuBow, 1997).

**Tableau 2.1 Formulations de l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) (% p/p)**

Type	CuO	CrO <sub>3</sub>	As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
CCA-A	18,1	65,5	16,4
CCA-B	19,6	35,3	45,1
CCA-C	18,5	47,5	34,0

L'utilisation exhaustive de CCA par l'industrie de préservation du bois soulève des inquiétudes concernant son risque potentiel pour l'environnement dû au lessivage de l'As, du Cr et du Cu du bois traité (Hingston *et al.*, 2001). En effet, sous des conditions environnementales appropriées, soit un pH acide (de l'eau de pluie ou de l'eau qui est en contact avec le bois traité) et en fonction des types de bois traités (Cooper, 1994 ; Carey *et al.*, 1996), les trois éléments sont susceptibles d'être mobilisables.

Suite à leur mobilisation, les compartiments de l'environnement les plus susceptibles d'être pollués par l'As, le Cr et le Cu sont le sol retrouvé à la base du bois traité et l'eau souterraine. En général, ce type de contamination mixte par l'As, le Cr et le Cu pourrait être rencontrée dans les cas suivants : sols retrouvés à la base de poteaux et des structures domestiques en bois traitées par du CCA, sols retrouvés sur les sites d'imprégnation de bois par du CCA et sols contaminés par des déversements accidentels de CCA.

### **2.1.2 Propriétés de l'As dans les sols contaminés par le CCA**

À ce jour, les études menées sur l'évaluation de l'impact des sols contaminés par l'As, le Cu et le Cr où la source de contamination est le CCA sont très peu nombreuses. Ces études ont montré que la contamination par l'As de ces sols est ponctuelle (le volume du sol contaminé est faible) et qu'en général, la concentration totale de l'As dépasse les critères acceptables pour des terrains à usage industriel établis par la législation de plusieurs pays. De plus, l'As représente le polluant le plus problématique étant donné sa forte toxicité et sa plus grande mobilité dans le sol par rapport au Cu et au Cr.

Par exemple, l'étude de Stilwell et Gorny (1997), qui a évalué la contamination des sols retrouvés à la base de 7 structures domestiques en bois traités par du CCA, a montré que la concentration moyenne de l'As dans les sols était égale à 76 mg/kg et les métaux se retrouvaient dans l'ordre suivant : Cu > As > Cr. Par rapport aux concentrations de Cu et

Cr qui diminuaient avec la profondeur, l'As était l'élément le plus mobile dans le sol, étant retrouvé jusqu'à 15 cm de profondeur.

Quant à l'évaluation de la contamination des sols retrouvés à la base de poteaux traités par du CCA, la littérature est à ce jour encore très limitée (Cooper et Ung, 1997 ; Chirenje *et al.*, 2003 ; Zagury *et al.*, 2003). Ces études ont montré que les concentrations d'As, de Cr et de Cu diminuent avec la distance aux poteaux, avec la profondeur et avec l'âge du poteau. Selon Cooper et Ung (1997) les concentrations en As, Cr et Cu près des poteaux ont été trouvées dans l'ordre suivant : Cu (1000 mg/kg) > As (550 mg/kg) > Cr (200 mg/kg). Zagury *et al.* (2003) ont examiné le niveau de contamination par l'As, le Cr et le Cu des sols retrouvés à la base de 6 poteaux de la région de Montréal (Québec). Les résultats ont montré que la concentration de métaux retrouvés dans le sol suivait le même ordre, soit Cu ( $1460 \pm 677$  mg/kg) > As ( $410 \pm 150$  mg/kg) > Cr ( $287 \pm 32$  mg/kg). La concentration moyenne de l'As très près des poteaux (<0,10 m) dépassait de 3 à 8 fois le critère maximal admis pour les sols à usage industriel pour le Québec, soit le critère C (50 mg As /kg) et dans quelques cas jusqu'à 2 fois le critère C à une profondeur de 0,5 m. Selon les mêmes auteurs, l'As est le polluant le plus problématique parmi les 3 éléments, puisqu'il est le plus mobile dans le sol. L'As était présent jusqu'à une profondeur de 1m dans le sol, avec une concentration de 17-54 mg/kg. Dans un seul cas, la concentration de l'As dans l'eau souterraine a dépassé le critère maximal admis de l'As pour l'eau potable (0,025 mg/l).

Dans les sols des sites d'imprégnation du bois, les concentrations en métaux se retrouvent, en général, dans le même ordre : Cu > As > Cr (Lund et Fobian, 1991). Ces sols sont caractérisés par des concentrations plus élevées d'As par rapport aux sols à la base de poteaux. Ainsi, à la surface du sol contaminé (0-10 cm) les concentrations peuvent varier d'environ 186 mg/kg (Bhattacharya *et al.*, 2002) jusqu'à 1350-27617 mg/kg (Turpeinen *et al.*, 2003). Dans ce cas aussi, l'arsenic a été classifié comme un

élément potentiellement dangereux, étant donné sa solubilité et sa mobilité plus élevée par rapport au Cu et au Cr (Andersen *et al.*, 1996 ; Turpeinen *et al.*, 2002).

Jusqu'à présent, l'évaluation de l'impact de l'As dans les sols a été étudiée en se basant seulement sur la concentration totale de l'As dans le sol. Toutefois, l'impact réel d'un sol contaminé par l'As pourrait être différent si on considère que la mobilité et la toxicité de l'As sont étroitement liées à sa spéciation.

## 2.2 Spéciation de l'As dans le sol

En raison de son caractère semi-métallique (groupe VA de la classification périodique) l'As a un comportement différent dans le sol par rapport aux métaux, se rapprochant plutôt de celui du phosphore qui se retrouve dans le même groupe. Cette caractéristique est due aux structures chimiques similaires de ces deux éléments. L'As possède les états d'oxydation suivants: +5 (arséniate), +3 (arsénite), 0 (arsenic élémentaire), et -3 (arsine), mais les seuls états d'oxydation stables en solution aqueuse, sont +5 et +3 (Jones, 1998).

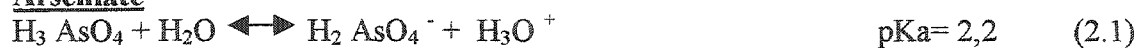
La connaissance de la spéciation de l'As dans le sol est essentielle étant donné que les formes chimiques de l'As affectent le transport, la persistance et la (phyto) toxicité de l'arsenic (Herreweghe *et al.*, 2003). Les formes chimiques de l'As susceptibles d'être rencontrées dans les sols contaminés par l'As sont les suivantes (Cullen et Reimer, 1989; Pongratz, 1998; Turpeinen *et al.*, 2002) :

- formes chimiques inorganiques: l'arséniate As(V), l'arsénite As(III) et l'arsine volatile AsH<sub>3</sub> ;
- formes chimiques organiques méthylées : l'acide d'arsenic monométhylé MMAA(V) (CH<sub>3</sub>AsO(OH)<sub>2</sub>), l'acide d'arsenic diméthylé DMAA (V) ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> AsO(OH)), l'oxyde de triméthylarsine ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> AsO), et les arsines volatiles, soient le monométhylarsine MMA (CH<sub>3</sub>AsH<sub>2</sub>), le diméthylarsine

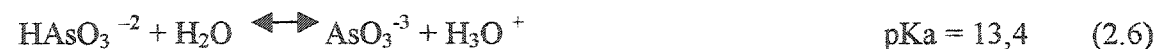
DMA ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsH), le triméthylarsine TMA ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>As), l'arsenobetaine AB et l'arsenocholine AC.

En général, les formes majoritaires de l'As dans la solution du sol sont les formes inorganiques, soient As(V) et As(III). Parmi les formes chimiques organiques solubles on retrouve le plus souvent, le MMAA et DMAA (Fitz et Wenzel, 2002). Étant donnée sa grande affinité pour l'oxygène, l'As se retrouve sous forme d'oxyanions avec différents degrés de déprotonation dans la solution du sol. Ainsi, l'As(V) se retrouve sous forme de H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub><sup>0</sup>, H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HAsO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, tandis que l'As(III) se retrouve sous forme de H<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub><sup>0</sup>, H<sub>2</sub>AsO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HAsO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Les formes méthylées, MMAA et DMAA sont aussi présentes dans la solution du sol, sous forme d'anions (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1999). Dans la solution aqueuse, les réactions d'équilibre et les constantes de dissociation de l'arséniate As(V), de l'arsénite As(III), de MMAA(V) et DMAA(V) sont les suivantes (Smith *et al.*, 1998) :

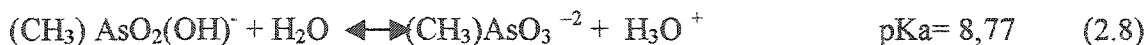
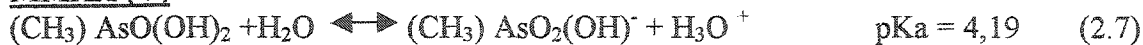
#### Arséniate

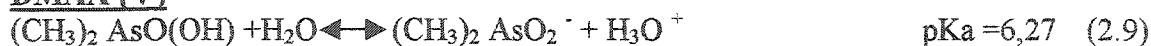


#### Arsénite



#### MMAA (V)



**DMAA (V)**

La présence des oxyanions dans la solution du sol dépend du pH. Ainsi, dans la gamme naturelle de pH du sol (4-8), les formes inorganiques de l'As les plus stables sont  $\text{H}_3\text{AsO}_3^0$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ . Quant aux formes méthylées, à un pH proche de 6, on retrouve le MMAA(V) sous la forme de  $(\text{CH}_3)\text{AsO}_2(\text{OH})^-$  et la forme anionique de DMAA(V) (O'Neill, 1995).

**2.2.1 Facteurs influençant la spéciation de l'As dans le sol**

La spéciation de l'As est spécifique à chaque sol et dépend d'une série de facteurs abiotiques et biotiques qui interagissent. Cette interrelation contrôle le rapport As(V)/As(III) soluble dans le sol et par la suite la solubilisation, la mobilisation et la biodisponibilité de l'As dans le sol. Les plus importants facteurs abiotiques qui peuvent influencer la spéciation de l'As dans le sol sont : le pH et le potentiel d'oxydoréduction (Eh), la minéralogie du sol et la matière organique. Les facteurs biotiques sont : les réactions biologiques d'oxydation/réduction et les mécanismes de méthylation/déméthylation de l'As dans le sol.

**2.2.1.1 Facteurs abiotiques****2.2.1.1.1 pH et potentiel d'oxydoréduction (Eh)**

À l'équilibre, la stabilité des formes chimiques de l'As dans la solution du sol est donnée par le diagramme d'équilibre thermodynamique (Eh-pH) (voir fig 2.1). Une autre façon d'exprimer la stabilité thermodynamique des formes chimiques de l'As

reconnue par les scientifiques et le diagramme ((pe+pH)-log (activité)) (voir figure 2.2).

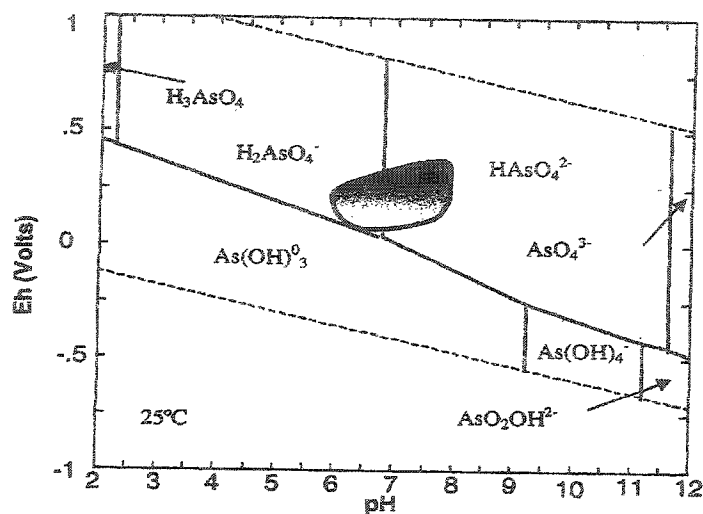


Figure 2.1 Stabilité des formes chimiques de l'As (298 K, 100 kPa,  $10^{-4}$  M) (Moore *et al.*, 2000)

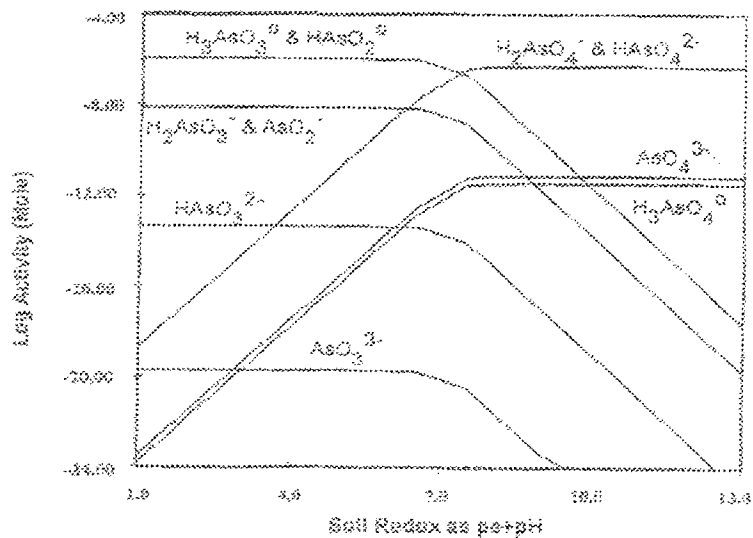


Figure 2.2 Stabilité des formes chimiques de l'As (298 K, 1 bar) (Sadiq, 1997)

Le terme (pe+pH), représente les conditions redox du système et a des valeurs comprises entre 0 et 21,6. Ainsi, le potentiel redox (Eh) du système, peut être exprimé,



aussi, par le  $p_e$  qui est une mesure de l'activité ( $p_e = -\log(\text{activité})$ ). La relation entre le  $p_e$  et le potentiel redox (Eh) à 25 °C est la suivante (Sadiq, 1997) :

$$p_e = Eh(V)/0,05 \quad (2.10)$$

En général, la valeur du potentiel redox (Eh) d'un système redox dépend des activités de la forme oxydante et réductrice et de la température, relation exprimée par l'équation de Nernst (Ure et Davidson, 2002):

$$Eh = E^0 - RT/nF \ln [\text{réductrice}] / [\text{oxydante}], (V) \quad (2.11)$$

où,

$E^0$  : le potentiel standard de réduction du couple redox (V) (mesuré dans les conditions standard, soit 298 degrés K, 1 atm, 1M)

R : la constante des gaz parfaits,  $R = 8,31 \text{ J/mol/degre K}$

F : la constante de Faraday,  $F = 96500 \text{ J/V}$

n : le nombre d'électrons échangés entre l'oxydant et le réducteur

[oxydante] : l'activité de la forme oxydante

[réductrice] : l'activité de la forme réductrice

Pour le système redox As(V)/As(III), la réaction de réduction est la suivante :



Selon les données thermodynamiques (voir figure 2.2), la forme prédominante de l'As dans la solution du sol, en conditions aérobies ( $p_e + pH > 10$ ), est l'As(V). En conditions anaérobies ( $p_e + pH < 6$ ), c'est l'As(III) qui prédomine et dans les conditions suboxiques ( $p_e + pH = 6-8$ ), les deux formes chimiques, As(III) et As(V) peuvent être présentes (Sadiq, 1997).

Jusqu'à présent, le suivi de la spéciation de l'As dans le sol, s'est limité à la fraction soluble de l'As, étant donné son danger écotoxicologique et son transport potentiel dans les couches plus profondes du sol. En plus, les études sur les formes chimiques de l'As dans la solution du sol *in situ* sont aussi très limitées. Toutefois, des informations concernant la spéciation de l'As soluble sont disponibles suite aux études réalisées en laboratoire, surtout dans des sols saturés. En général, ces études ont montré que la spéciation de l'As soluble est en accord avec les données thermodynamiques à l'équilibre (Masscheleyn *et al.*, 1991; MCGeehan et Naylor, 1994; Howell *et al.*, 1994; Ruokolainen *et al.*, 2000).

Par exemple, selon Masscheleyn *et al.* (1991), la forme prédominante de l'As dans la solution d'un sol en conditions aérobies (200-500 mV) était l'As(V) (65-98%), tandis que dans des conditions réductrices (<100 mV) la forme chimique prédominante était l'As(III). De plus, selon Howell *et al.* (1994), un pH acide du sol peut entraîner la formation de l'As(III) soluble dans une proportion élevée même dans des conditions aérobies. Ainsi, il a été montré que dans un sol acide qui provenait d'un site minier, la proportion d'As (III) soluble était de 45 % en conditions aérobies, tandis qu'en conditions anaérobies elle était de 79 %.

Selon l'étude de Onken et Hossner (1995), la spéciation de l'As soluble en fonction du temps dans deux sols inondés était conforme aux conditions redox. Dans les sols traités par l'As(III) (arsénite de sodium, 25 mg As/kg), l'As(III) était oxydé en As(V) jusqu'à ce que les conditions redox soient devenues réductrices. Dans les sols traités par l'As(V) (arséniate de sodium, 25 mg As/kg), la proportion de l'As(III) augmentait dans la solution du sol pendant le temps avec la diminution du potentiel redox. Cependant, une réduction complète de l'As(V) en As(III) n'a pas été observée.

Ruokolainen *et al.* (2000), dans une étude sur la mobilisation de l'As dans une colonne qui « mimait » un système sol-eau-sédiment, ont montré aussi que la majorité de l'As

mobilisé dans l'eau et dans les sédiments moins profonds était sous forme d'As(V). Dans les sédiments plus profonds (conditions fortement réductrices) c'était l'As(III) qui prédominait.

D'après les études de Turpeinen *et al.* (1999, 2002) qui portaient sur la spéciation de l'As soluble des sols fortement contaminés par l'As en provenance des sites d'imprégnation du bois par le CCA, la forme majoritaire de l'As soluble était l'As(V) tant en conditions aérobies qu'anaérobies et les concentrations des composés méthylés solubles, MMAA et DMAA, étaient très faibles (<1 mg/kg).

La présence de certaines conditions dans le sol peut mener à une spéciation de l'As soluble non-conforme aux prédictions théoriques basées sur le diagramme d'équilibre thermodynamique. La persistance de l'As(V) soluble dans des conditions anaérobies pourrait être due à deux facteurs (Masscheleyn *et al.*, 1991) :

- la présence des micro-organismes capables de réduire le Fe(III) (des oxydes de Fe du sol) en Fe(II) par la respiration anaérobie. Ainsi, par la dissolution réductive d'oxydes de Fe a lieu la libération de l'As(V) adsorbé à leur surface;
- l'oxydation de l'As(III) en As(V) en présence des oxydes de Mn(IV) du sol.

Dans le cas de la formation de l'As(III) dans le sol en conditions aérobies, deux facteurs de non-équilibre sont possibles :

- la présence des microorganismes capables de réduire l'As(V) en As(III) par un mécanisme de résistance à l'As (la détoxification) (Macur *et al.*, 2001);
- la présence de la matière organique (Balasoiu *et al.*, 2001; Redman *et al.*, 2002). Selon l'étude de Balasoiu *et al.* (2001) qui a évalué la spéciation de l'As dans la phase solide des sols artificiels contaminés par As(V) (sous la forme de CCA), plus le sol était organique plus la proportion de l'As(III) retrouvée dans le sol était élevée. Il faut noter que dans cette étude le potentiel redox n'a pas été mesuré lors de la contamination du sol, ni pendant l'incubation.

### 2.2.1.1.2 Minéralogie du sol

En général, la surface des minéraux peut catalyser les réactions redox ou être elle-même un agent oxydant ou réducteur. L'étude de l'influence des minéraux des argiles et des oxydes de Fe et Mn sur la spéciation de l'As a reçu une attention particulière dans les dernières années. En effet, la présence dans les sols des oxydes de Mn(IV), des oxyhydroxydes de Fe et des argiles, est susceptible d'oxyder l'As(III) en As(V) plus rapidement que l'O<sub>2(g)</sub>. La demi-vie de l'oxydation de l'As(III) via l'O<sub>2(g)</sub> est très lente, soit d'environ une année (Inskeep *et al.*, 2002).

L'oxydation de l'As(III) par ces composantes minérales a été mise en évidence seulement en suspension (Scott et Morgan, 1995; Sun et Doner, 1998; Manning et Golberg 1997b; Lin et Puls, 2000). En général, les oxydes de Mn sont des oxydants plus forts ( $E^0 \text{MnO}_2/\text{Mn}^{+2} = +1,23 \text{ V}$ ) que les oxydes de Fe ( $E^0 \text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}^{+2} = +1,05 \text{ V}$ ), et leur pouvoir d'oxydation de l'As(III) soluble dépend du pH. Ainsi, le Fe(III) est plus efficace à un pH acide ( $< 4$ ), tandis que les oxydes de Mn(IV) peuvent être des oxydants très efficaces de l'As(III) tant en conditions acides qu'alcalines (Essington, 2003 ; Inskeep *et al.*, 2002). D'autre part, il est connu que l'oxydation de l'As(III) dans une solution homogène (sans minéraux) peut avoir lieu à un pH basique ( $\text{pH} > 9$ ). Toutefois, la présence des argiles dans la solution peut favoriser l'oxydation de l'As(III) en As(V) à un  $\text{pH} < 9$  (Manning et Golberg, 1997). Cependant, le taux d'oxydation de l'As(III) en As(V), en présence des argiles dépend, tant en conditions aérobies qu'anaérobies, de la nature des argiles et du temps de vieillissement de la contamination (Lin et Puls, 2000).

À travers ces études, le mécanisme responsable de l'oxydation de l'As(III) en As(V) par les minéraux n'a pas été compris dans sa complexité et des études supplémentaires sont nécessaires. Jusqu'à présent, l'explication avancée par plusieurs auteurs est la présence des certaines impuretés à la surface des minéraux (Lin et Puls, 2000). Néanmoins, l'influence de ces composantes sur l'oxydation de l'As(III) en As(V) dans des systèmes plus complexes, tel que le sol, n'a pas été encore élucidée.

### 2.2.1.1.3 Matière organique

Le rôle de la matière organique sur la spéciation de l'As dans la fraction soluble et solide du sol, n'a pas été encore expliqué par les quelques études portant sur le sujet (Balasoiu *et al.*, 2001 ; Redman *et al.*, 2002 ; Turpeinen *et al.*, 2002). D'une manière générale, la matière organique du sol est considérée comme un réservoir de donneurs d'électrons ou un catalyseur potentiel dans les réactions d'oxydation /réduction de nombreuses espèces chimiques, en partie grâce à la présence des radicaux libres de la structure des quinones. Les radicaux libres peuvent favoriser le transfert d'électrons entre différentes espèces redox autrement cinétiquement inertes ou entre les microorganismes et les métaux (Redman *et al.*, 2002).

Les travaux de Balasoiu *et al.* (2001) ont mis en évidence pour la première fois que la teneur en matière organique pouvait être un important facteur d'influence sur la réduction de l'As(V) en As(III) dans la phase solide du sol. Il a été observé dans le cas des sols synthétiques contaminés artificiellement par l'As(V) (au moyen d'une solution de CCA) et à un pH=5,5, que la proportion totale de l'As(III) dans les sols augmentait avec la teneur en matière organique (tourbe) du sol.

Cependant, l'influence de la matière organique sur la spéciation d'As soluble soulève encore des avis contradictoires (Redman *et al.*, 2002, Turpeinen *et al.*, 2002). Selon l'étude de Turpeinen *et al.* (2002) menée sur des sols en provenance des sites d'imprégnation du bois par le CCA, l'ajout d'une source de carbone facilement biodégradable dans le sol (0,2 % de glucose) (pH=7) n'a pas influencé significativement la réduction biologique et abiotique de l'As(V) soluble en fonction du temps tant en conditions aérobies qu'anaérobies. En revanche, selon l'étude de Redman *et al.* (2002) menée en conditions aérobies, la matière organique dissoute peut avoir tant une capacité réductrice de l'As(V) soluble qu'une capacité oxydative de l'As(III) soluble. Cette étude était menée sur 6 échantillons d'eau contenant de la matière organique dissoute de nature différente (10 mg C/l, en présence d'hématite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et à un pH=6). En effet,

quel que soit le scénario (matière organique-hématite + arsénite (arséniate) ou arsénite (arséniate)-hématite + matière organique), la matière organique dissoute favorisait plus l'oxydation de l'As(III) soluble en As(V) que la réduction de l'As(V) en As(III). Toutefois, la réduction de l'As(V) en As(III) par la matière organique dans tous les cas était intensifiée en présence d'hématite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), supposé être un catalyseur dans la réaction de réduction de l'As(V).

En conclusion, la spéciation de l'As soluble dans le sol est généralement en accord avec les prédictions thermodynamiques. Cependant, dans les sols, il existe des facteurs abiotiques susceptibles de modifier la spéciation de l'As. Les oxydes de Fe, les oxydes de Mn et les argiles sont des composantes du sol susceptibles d'oxyder l'As(III) soluble en As(V). L'influence de la matière organique du sol sur la spéciation de l'As soluble est encore plus difficile à prévoir puisque la matière organique dissoute pourrait avoir tant des capacités réductrices de l'As(V) que des capacités oxydatives de l'As(III) en fonction de sa nature, ou elle n'influence pas la spéciation de l'As soluble. De plus, le rôle de la matière organique sur la réduction de l'As(V) dans la phase solide du sol n'a pas été encore élucidé. En conséquence, étant donné le manque de consensus et l'inconsistance de la littérature concernant le rôle de la matière organique sur la spéciation de l'As, tant dans la fraction soluble que dans la phase solide du sol, des études supplémentaires sont nécessaires.

#### **2.2.1.2 Facteurs biotiques**

La spéciation de l'As dans le sol est également influencée par la présence des microorganismes. Les principaux mécanismes biologiques de transformation de l'As qui peuvent avoir lieu dans le sol sont : 1) l'oxydation de l'As(III) en As(V), 2) la réduction de l'As(V) en As(III), 3) la méthylation de l'As, 4) la déméthylation de l'As (Inskeep *et al.*, 2002; Turpeinen *et al.*, 2002).

Les transformations biotiques de l'As dans le sol ont un rôle important dans le cycle global de l'As dans l'environnement (figure 2.3). On considère que pour entrer dans le cycle biologique, l'As doit être sous sa forme dissoute (Tamaki et Frankenberger, 1992).

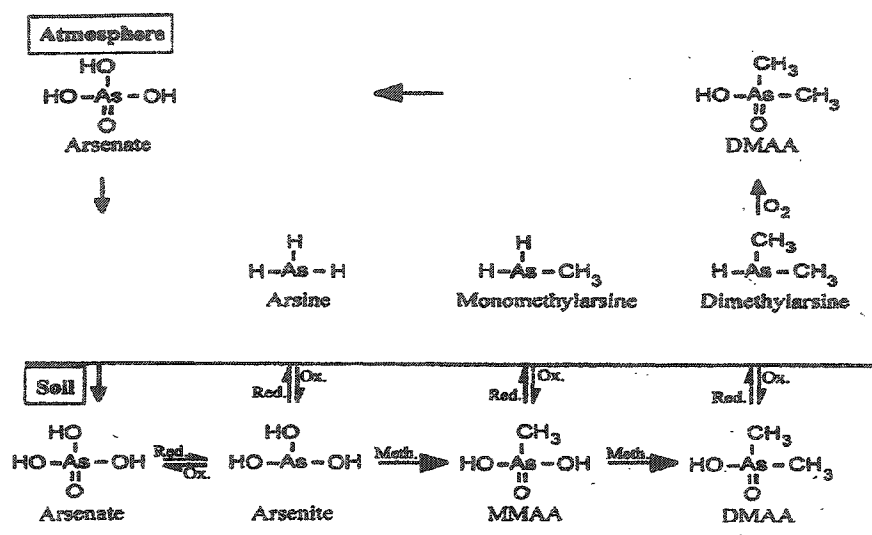


Figure 2.3 Transformations biotiques de l'As dans le sol (Pongratz, 1998)

Dans le sol, l'As(V) peut être réduit en As (III) en présence d'espèces microbiennes spécifiques. Ensuite, des transformations de l'As(III) peuvent avoir lieu par la méthylation biologique en MMAA et DMAA, et les composés méthylés peuvent être aussi réduits en méthylarsines en présence d'autres espèces microbiennes. Les arsines volatiles sont transférées du sol à l'atmosphère et par un processus d'oxydation sont retransformées en composés inorganiques. Le cycle de l'As est complété avec la déposition de l'As(V) au sol par les précipitations.

#### 2.2.1.2.1 Oxydation biologique de l'As(III)

Dans la littérature, il y a des lacunes en ce qui concerne les études sur l'oxydation biologique de l'As(III) dans le sol. Toutefois, il est reconnu que l'oxydation de l'As(III)

en As(V) représente un mécanisme potentiel de détoxification du sol. On considère que les microorganismes hétérotrophes catalysent l'oxydation de 78 à 96 % de l'As(III) dans le sol (Tamaki et Frankenberg, 1992). L'oxydation de l'As(III) par les hétérotrophes peut avoir lieu soit en utilisant l'As(III) comme source d'énergie auxiliaire, soit par un mécanisme de détoxification ; des études sont encore nécessaires pour faire une distinction claire entre les deux mécanismes (Frankenberger, 2002). Parmi les bactéries isolées capables d'oxyder l'As(III) en As(V), on peut nommer *Bacillus arsenoxydans*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes sp.*, et *Agrobacterium*.

Selon Macur *et al.* (2001, 2004), dans un sol aérobie contaminé par l'As, il pourrait exister à la fois des microorganismes capables d'oxyder l'As(III) soluble que des microorganismes capables de réduire l'As(V) soluble. Ainsi, les résultats d'une étude de Macur *et al.* (2001) menée sur un sol contaminé par l'As(III) ont montré que l'As(III) soluble était rapidement oxydé à l'As(V) par un mécanisme de détoxification tant en conditions saturées que non-saturées. Dans le cas de la contamination du même sol par l'As(V), la réduction biologique de l'As(V) en As(III) soluble a eu aussi lieu, mais sa cinétique était dépendante du contenu en eau de sol. En conditions aérobies et non-saturées, la cinétique de réduction de l'As(V) était très lente, tandis qu'elle était complète dans le sol saturé (Inskeep *et al.*, 2002).

Macur *et al.* (2004) ont étudié en colonne l'influence des microorganismes sur la spéciation de l'As soluble en conditions aérobies dans un sol contaminé par l'As(III) ( $\text{NaH}_2\text{AsO}_3$ ) et par l'As(V) ( $\text{NaH}_2\text{AsO}_4$ ). Dans les deux cas de contamination, la forme prédominante de l'As dans l'effluent était l'As(V). En dépit du fait que des microorganismes isolés du sol étaient capables de réduire l'As(V) en As(III) en solution, dans la colonne, seule l'oxydation de l'As(III) en As(V) par un mécanisme de détoxification s'est produit.



#### 2.2.1.2.2 Réduction biologique de l'As (V)

En général, les mécanismes biologiques enzymatiques de réduction ont lieu en parallèle avec les mécanismes de réduction chimiques. La réduction biologique de l'As(V) en As(III) peut avoir lieu selon deux mécanismes:

- réduction « dissimilatory » susceptible d'être présente dans les sols anaérobies, où l'As(V) est un accepteur d'électrons dans la respiration anaérobie.
- la détoxification, qui peut avoir lieu dans des milieux aérobie et anaérobies, où la réduction de l'As(V) est réalisée grâce à un mécanisme de résistance des micro-organismes.

#### *Réduction « dissimilatory » de l'As(V)*

La réduction « dissimilatory » de l'As(V) est un mécanisme de respiration anaérobie de l'As pendant lequel des électrons se déplacent des donneurs d'électrons (matière organique, H<sub>2</sub>) vers l'As qui est l'accepteur d'électrons et une quantité d'énergie est libérée pour la croissance bactérienne. La chaîne de transport des électrons est composée principalement de transporteurs d'électrons de type cytochromes-c situés dans la membrane cytoplasmique des bactéries (Ahmann *et al.*, 1997). La réduction « dissimilatory » de l'As(V) est contrôlée par une enzyme réductase respiratoire située dans la membrane cytoplasmique de certaines bactéries anaérobies, le produit final de la réduction, soit l'As(III) étant excrété par la cellule comme un déchet. L'identification de la première bactérie anaérobie *MIT-13*, capable d'utiliser l'As comme accepteur d'électrons, remonte à 1994 et a été isolée de sédiments.

Des espèces bactériennes anaérobies (*Sulfurospirillum barnessi* (SES-3), *S.arsenophilus*(MIT-13), *Desulfotomaculum auripigmentum*, *Crysiogenes arsenati*, *Pseudomonas spp.*, des bactéries sulfato-réductrices) responsables de la réduction de l'As(V) en As(III) par le mécanisme de réduction dissimilatory ont été isolées jusqu'à présent de sédiments contaminés (Lavermann *et al.*, 1995; Ahmann *et al.*, 1997; Harrington *et al.*, 1998; Dowdle *et al.*, 1996; Zobrist, 2000; Macur *et al.*, 2004). Dans le

cadre de ces études, la réduction de l'As(V) en As(III) était mise en évidence dans la solution en présence de sources de carbone facilement biodégradables (donneurs d'électrons), soit de l'acétate, du lactate, du butyrate ou du glucose. Les principaux facteurs qui influençaient le taux de réduction de l'As(V) en As(III) par ce mécanisme étaient: la concentration de l'As, la présence d'autres accepteurs d'électrons et la densité microbienne spécifique. De plus, il a été montré que la mobilisation de l'As(III) suite à la réduction de l'As(V) était gouvernée par l'adsorption de l'As(III) sur les oxydes de Fe et Al présents dans la solution (Zobrist *et al.*, 2000). Néanmoins, l'importance de la réduction de l'As(V) en As(III) par ces espèces bactériennes sur la mobilisation de l'As dans les sédiments *in situ* n'a pas été encore élucidée. Un autre mécanisme de réduction « dissimilatory » considéré comme plus important que la réduction d'As(V) en As(III) dans la mobilisation de l'As, est le mécanisme de réduction du Fe(III) (des oxydes de Fe) en Fe(II). Ce mécanisme par lequel l'As adsorbé aux oxydes de Fe(III) est relâché dans l'environnement, est supposé être responsable de la concentration très élevée de l'As retrouvée dans les eaux souterraines au Bangladesh (Cummings *et al.*, 1999).

Bien que le mécanisme de réduction « dissimilatory » de l'As(V) soit susceptible d'avoir lieu dans des sols anaérobies contaminés par l'As, aucune étude n'a encore été menée pour le démontrer.

### ***Réduction de l'As(V) par la détoxification***

En général, les microorganismes démontrent une certaine résistance aux fortes concentrations en métaux et métalloïdes en développant des systèmes de résistance, soit chromosomiques, soit au niveau des plasmides. Le plus répandu mécanisme de résistance des micro-organismes à l'As(V) est le mécanisme de détoxification. Par rapport au mécanisme de réduction « dissimilatory », la réduction de l'As(V) par la détoxification a lieu intracellulaire grâce à une enzyme arséniate réductase située dans un opéron *ars* dans le plasmide bactérien. Suite à la réduction de l'As(V), l'As(III) est expulsé à l'extérieur du cytoplasme. Certains micro-organismes responsables de la

réduction de l'As(V) par détoxification ont été identifiés, tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylophilus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Thiobacillus*, *Caulobacter*, *Dsphenomonas*, *Rhizobium* (Tamaki et Frankenberger, 1992 ; Cervantes *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 2000; Langner et Inskeep, 2000 ; Macur *et al.*, 2001). Jusqu'à présent la contribution de ce mécanisme, en conditions anaérobies et aérobies, sur la réduction de l'As(V) en As(III) et par conséquent sur la mobilisation de l'As dans les sols a été très peu étudiée. Selon l'étude de Jones *et al.* (2000), l'As(V) était réduit rapidement en As(III) (dans la solution) en conditions anaérobies, par un mécanisme de détoxification en présence de l'espèce microbienne *Clostridium*, isolée d'un sol contaminé par l'As. Toutefois, étant donné que cette espèce microbienne n'était pas majoritaire, le taux de réduction de l'As(V) en As(III) en présence de la microflore isolée du sol était très faible. De plus, les auteurs ont conclu aussi que le taux de mobilisation de l'As(III) suite à la réduction de l'As(V) en As(III) par ce mécanisme biologique était dépendant de la surface des oxydes présents dans la suspension.

Selon Macur *et al.* (2001), le mécanisme de détoxification est un mécanisme susceptible de contribuer aux conditions de non-équilibre dans les sols aérobies contaminés par l'As, soit peut être responsable de la formation de l'As(III) soluble dans le sol, dans une proportion plus grande que prévue selon les données thermodynamiques. Le but de cette étude menée en colonnes (biotique et abiotique) (en présence d'une source de carbone supplémentaire, soit du glucose et du lactate), était d'évaluer la mobilisation et la spéciation de l'As soluble dans un résidu minier après le chaulage dans des conditions aérobies (>400mV). Ainsi, il a été mis en évidence que la présence des micro-organismes a augmenté la solubilisation de l'As dans le sol sous forme majoritaire d'As(III). La formation de l'As(III) en concentration plus grande que prévue en conditions aérobies et en présence des micro-organismes était attribuée au mécanisme de détoxification. Cette étude est la première qui démontre que la mobilisation de l'As sous la forme de l'As(III) peut avoir lieu rapidement dans les sols aérobies par la

réduction de l'As(V) via le mécanisme de détoxification. Ce mécanisme pourrait être largement répandu dans les sols aérobies et, si cela est le cas, il devrait être pris en considération dans le cycle biochimique de l'As (Macur *et al.*, 2001; Inskeep *et al.*, 2002).

En conclusion, la présence de micro-organismes est un facteur important dans le devenir de l'As dans le sol. Ils sont capables de modifier la spéciation de l'As par l'entremise de réactions d'oxydoréduction, modifications entraînant des changements de la solubilité, mobilité et toxicité de l'As dans le sol. Dans les sols aérobies, l'oxydation biologique de l'As(III) semble être un mécanisme largement répandu qui implique la formation d'une forme chimique moins toxique, soit l'As(V). En revanche, la formation de l'As(III) dans le sol, la forme la plus toxique et mobile, est susceptible d'avoir lieu par deux mécanismes de réduction biologique de l'As(V): 1) la détoxification tant dans des conditions aérobies qu'anaérobies et 2) la réduction « dissimilatory » dans des conditions anaérobies. En plus, le mécanisme de détoxification est susceptible d'être un facteur de non-équilibre dans les sols aérobies menant à la formation de l'As(III) soluble. Quant aux sols contaminés par l'As, où la source de contamination est le CCA, aucune étude n'a encore été menée pour démontrer l'oxydation biologique de l'As(III) en As(V) ou la réduction biologique de l'As(V) en As(III) dans le sol.

#### **2.2.1.2.3 Méthylation/déméthylation de l'As**

La méthylation et la déméthylation de l'As dans le sol sont dus exclusivement à l'activité microbienne (Sadiq, 1997 ; Turpeinen *et al.*, 1999 ; Frankenberger et Arshad, 2002). La méthylation biologique de l'As mène à la formation des composés suivants (voir figure 2.2) :

- composés méthylés solubles : MMAA, DMAA et TMAO;
- composés méthylés volatiles (arsines) : monométhylarsine ( $\text{CH}_3\text{AsH}_2$ ) à partir de MMAA, diméthylarsine ( $((\text{CH}_3)_2\text{AsH})$ ) à partir de DMAA, la triméthylarsine

((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>As)) à partir de TMAO et les arsines AsH<sub>3</sub> à partir de As(III) (Turpeinen, 2002).

La méthylation est un mécanisme potentiel de détoxification du sol par lequel l'arsenic inorganique peut être transformé en composés organiques moins toxiques comme le MMAA et le DMAA. Étant donné que ces composés sont mobiles dans le sol, la méthylation pourrait être également un mécanisme important de phytoremédiation des sols contaminés par l'As (Pongratz, 1998). La formation de composés méthylés d'As est spécifique à chaque sol et dépend de plusieurs facteurs : le type de micro-organismes impliqués, la concentration de l'As, les formes chimiques de l'As et les conditions redox du sol. En conditions aérobies, la méthylation de l'As est influencée tant par la présence des champignons que par celle des bactéries. En conditions anaérobies, les microorganismes influant le plus sur la méthylation de l'As sont les bactéries méthanogènes (Tamaki et Frankenberger, 1992 ; Sadiq, 1997).

En général, la formation des arsines est plus intense à partir de composés organiques de l'As appliqués aux sols qu'à partir des composés inorganiques. De plus, leur formation en conditions anaérobies est bien connue, tandis que leur formation et leur stabilité en conditions aérobies sont peu connues. La formation des arsines volatiles sous forme d'AsH<sub>3</sub> (la forme la plus toxique de l'As) a lieu à partir de l'As(III) en conditions fortement réductrices et acides (Frankenberger et Arshad, 2002). Cependant, la durée de vie des méthylarsines dans l'air est considérée très courte à cause du contact chimique avec les précipitations qui mène à leur transformation rapide en composés solubles (Turpeinen *et al.*, 2002). La présence de métaux et d'autres éléments dans le sol peut inhiber ou augmenter les transformations microbiologiques de l'As, en fonction de la nature et de la concentration de l'élément présent. Par exemple, la volatilisation de l'As peut être stimulée par des concentrations faibles de métaux et métalloïdes (0,1-1 μM), tandis que la présence du phosphate et sélénate inhibe la formation des composés méthylés de l'As (Frankenberger et Arshad, 2002). Quant à l'influence de la teneur en

matière organique du sol sur la volatilisation de l'As, il n'existe pas encore de consensus. Par exemple, selon Turpeinen *et al.* (2003), l'addition de glucose (0,2%) dans un sol contaminé par le CCA n'influçait pas la volatilisation de l'As sous forme de trimethylarsines.

Les études portant sur la formation de MMAA et de DMAA solubles dans les sols contaminés par As où la source de contamination est le CCA sont rares (Turpeinen *et al.*, 1999; Ruokolainen *et al.*, 2000). En général, la production de ces composés, en conditions de laboratoire était faible (équivalent à des concentrations de l'ordre du microgramme par litre) tant en conditions aérobies qu'anaérobies. Selon Turpeinen *et al.* (1999, 2002), dans le cas d'un sol en provenance d'un site d'impregnation du bois par le CCA, la production de ces composés était de 0,1%-0,48% pendant une période d'incubation de 5-10 jours.

L'importance du mécanisme de méthylation de l'As *in situ* et l'identité des facteurs d'influence ne sont pas encore élucidées. Selon Pongratz (1998), la formation de MMAA et DMAA solubles *in situ* n'est pas inhibée par une forte contamination du sol par l'As (2000 mg/kg), mais les concentrations de MMAA et DMAA formées sont très faibles (inférieures à 7 µg/l). Parmi les facteurs qui sont susceptibles d'influencer la formation de MMAA et DMAA solubles on retrouve: la concentration de l'As soluble (une concentration seuil de l'As soluble serait nécessaire pour induire la méthylation), la toxicité des formes chimiques de l'As présentes, le pH, les conditions redox (Bowell *et al.*, 1994 ; Carbonell-Barrachina *et al.*, 1999). Par exemple, selon Bowell *et al.* (1994) la formation de MMAA et DMMA dans un sol acide a été favorisée seulement dans des conditions aérobies, tandis qu'en conditions anaérobies les composés méthylés n'ont pas été formés. Selon la littérature, la matière organique du sol est susceptible de favoriser la formation de MMAA et DMAA solubles par une augmentation de l'activité microbienne mais, jusqu'à présent, aucune étude ne le démontre. Par contre, dans le cas d'un sol contaminé par l'As prélevé d'un site d'imprégnation du bois, l'addition d'une

source de carbone supplémentaire (glucose, 0,2 %), n'avait pas d'influence sur la production de MMAA et DMAA solubles, tant en conditions aérobies qu'anaérobies (Turpeinen *et al.*, 2002).

Les composés méthylés de l'As présents dans le sol peuvent être deméthylés par des micro-organismes spécifiques, mécanisme par lequel les formes organiques sont minéralisées en formes inorganiques. Les conditions environnementales qui influencent la déméthylation de l'As ne sont pas connues. Toutefois, dans certains cas, la déméthylation de l'As en conditions aérobies augmentait avec la concentration du composé méthylé, avec la teneur en matière organique et avec le contenu en eau du sol (Frankenberger et Arshad, 1992).

En conclusion, la méthylation et la déméthylation de l'As sont spécifiques à chaque sol et dépendent de la nature des microorganismes, des conditions environnementales, de la présence d'autres formes chimiques de l'As et d'autres éléments dans le sol. Jusqu'à présent, les études ont montré que la formation des composés méthylés solubles moins toxiques, soit le MMAA et le DMAA, dans des sols contaminés par l'As, où la source de contamination était le CCA, était d'une importance mineure. De plus, les principaux facteurs d'influence de la méthylation et déméthylation de l'As dans le sol ne sont pas encore entièrement compris. La connaissance de ces facteurs est importante afin de prévoir la formation de MMAA et DMAA solubles moins toxiques dans le sol. En conséquence, un des objectifs de la présente étude vise à évaluer l'influence de la teneur en matière organique sur la méthylation de l'As dans le sol.

### **2.3 Toxicité de l'arsenic**

La connaissance des formes chimiques de l'As est d'une importance fondamentale lors de l'évaluation de sa toxicité dans le sol. Il est bien connu que la toxicité de l'As varie selon ses formes chimiques, les formes inorganiques étant plus toxiques que les formes

organiques méthylées. La toxicité de l'As diminue dans l'ordre suivant (Smith *et al.*, 1998) :  $\text{AsH}_3 > \text{As(III)} > \text{As(V)} > \text{MMAA(V)} > \text{DMAA(V)}$

Pour les humains, la forme chimique la plus toxique est l'arsine volatile  $\text{AsH}_3$ . Les formes inorganiques de l'As, soient  $\text{As(V)}$  et  $\text{As(III)}$  sont d'environ 100 fois plus toxiques que les composés organiques méthylés, MMAA et DMAA et l' $\text{As(III)}$  est d'environ 60 fois plus toxique que l' $\text{As(V)}$  (Cervantes *et al.*, 1994 ; Jain et Ali, 2000). Les différences de toxicité entre l' $\text{As(III)}$  et l' $\text{As(V)}$  pour les plantes, microorganismes et animaux sont dues aux différents mécanismes causant la toxicité. Ainsi, la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) est inhibée par l' $\text{As(V)}$  due à la similitude avec le phosphate, tandis que l' $\text{As(III)}$  bloque le fonctionnement des enzymes en réagissant avec les groupes sulfhydryl des protéines (Jones, 1998). Les formes méthylées, MMAA(V) et DMAA(V) sont moins toxiques à cause de leur faible solubilité et de leur affinité réduite pour les tissus et leur toxicité diminue avec l'augmentation du degré de méthylation (Fitz et Wenzel, 2002). D'autres composés organiques de l'As, soit l'arsenobetaine (AB) et l'arsenocholine (AC), rencontrés surtout dans les organismes marins, sont considérés non toxiques (Pongratz, 1998).

Les humains sont exposés à l'As par plusieurs voies : ingestion de l'eau et de la nourriture, inhalation des poussières et des composés volatiles de l'As, ingestion de particules de sol surtout par les enfants et, dans une moindre mesure, par l'absorption cutanée). La plus importante voie d'exposition des humains à l'As demeure la consommation de l'eau. La contamination de l'eau souterraine par l'As, utilisée comme source principale de l'eau potable, a été rapportée dans nombreux pays : Bangladesh, Inde, Vietnam, Népal, Taiwan, China, Chile, Mexico, Peru, Hongrie (Ng *et al.*, 2003). L'As peut s'accumuler dans les ongles et les cheveux à cause de la liaison de l' $\text{As(III)}$  avec les protéines retrouvées dans la kératine. Une exposition prolongée à l'As mène à des maladies cutanées importantes, comme l'hypo et l'hyper pigmentation de la peau, à des maladies cardiovasculaires, au diabète et au cancer (Ng *et al.*, 2003). Selon l'Agence



de Recherche pour le Cancer (IARC, 1980, 1987) et l'Agence de Protection de l'Environnement Américaine (U.S.EPA, 1988), l'arsenic inorganique a été classifié comme un carcinogène humain (Hughes, 2002). Les études épidémiologiques menées dans les pays plus affectés (Taiwan, Chili, Argentine) ont démontré qu'il y a une corrélation directe entre l'exposition à l'As par la consommation d'eau (d'ordre de centaines et milliers de  $\mu\text{g/l}$ ) et l'apparition de cancer de la peau, des reins et du poumon. Le risque de cancer associé aux faibles concentrations de l'As dans l'eau potable (égale à la concentration de l'As maximale admissible pour l'eau potable) est encore controversé (Smith *et al.*, 2002 b).

La majorité de l'As inorganique ingéré est transformée dans le corps humain en composés méthylés, par biométhylation, puis excrétée par l'urine. La méthylation de l'As dans le corps humain implique tout d'abord une réduction de l'As(V) en As(III) suivie de la formation de composés pentavalents organiques MMAA(V) et DMAA(V) par l'ajout oxydatif d'un groupe méthylé à l'As(III). Toutefois, la découverte récente de la présence dans le corps humain des composés méthylés trivalents, MMAA(III)  $((\text{CH}_3)\text{As}(\text{OH})_2)$  et DMAA(III)  $((\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{OH}))$  très toxiques, démontre que la méthylation de l'As pourrait ne pas être un processus de détoxification de l'As dans le corps humain (Hughes, 2002).

L'arsenic, par sa toxicité, peut aussi affecter l'activité des micro-organismes du sol, facteur important dans la spéciation de l'As. On considère que les bactéries sont environ 10 fois plus résistantes à l'As(V) qu'à l'As(III) (Tamaki et Frankenberger, 1992). En général, la toxicité de l'As pour les microorganismes du sol dépend de la nature des microorganismes, de la spéciation de l'As, et de la biodisponibilité de l'As qui est influencée par les caractéristiques physico-chimiques du sol et par le temps. En général, la toxicité de l'As dans le sol diminue au cours du temps via la diminution de sa solubilité et biodisponibilité (Turpeinen *et al.*, 2003).

Dans le cas des sols contaminés par le CCA, des études ont mis en évidence qu'il peut exister une activité microbienne malgré une forte pollution par l'As, le Cu et le Cr (Turpeinen *et al.*, 1999, 2002). Selon une étude de Turpeinen *et al.* (article en preparation), la structure de la population microbienne dans un sol contaminé par l'As, el Cu et le Cr en provenance d'un site d'impregnation du bois, change avec le temps de l'exposition à la contamination. Aussi, il a été montré que la proportion des bactéries résistantes à l'As(V) était élevée et indépendante de la concentration de l'As dans le sol, tandis que la proportion des bactéries résistantes à l'As(III) était faible est dépendante de la concentration de l'As dans le sol (Turpeinen, 2002). Selon Yeates *et al.* (1994), il n'est pas possible d'isoler les effets de la toxicité de l'As sur les propriétés biologiques du sol des effets des autres composantes du CCA retrouvés dans le sol.

## **2.4 Solubilité et biodisponibilité de l'As dans le sol**

### **2.4.1 Concept de biodisponibilité**

Un sol contaminé par l'As aurait un impact faible ou nul sur les organismes supérieurs, plantes et faune du sol, lorsque la fraction de l'As biodisponible du sol pour les microorganismes du sol est faible (Turpeinen *et al.*, 2003). En effet, l'effet écotoxique de l'As dans le sol est très complexe et la biodisponibilité y joue un rôle très important (Flynn *et al.*, 2002). Selon la définition de Caussy (2003), la biodisponibilité représente, en général, la fraction de la dose du polluant externe qui atteint le système circulatoire de l'organisme exposé au polluant, tout en causant un effet biologique. Toutefois, étant donné que la fraction de la dose externe de polluant qui est disponible pour l'adsorption (bioaccessibilité) est largement reliée à la fraction soluble du polluant, les études dans le but de simplifier, ne font généralement pas de distinction entre la bioaccessibilité et la biodisponibilité (Caussy, 2003).

#### 2.4.2 Facteurs influençant la solubilité et la biodisponibilité de l'As dans le sol

On considère qu'en se basant seulement sur la concentration totale de l'As dans le sol, l'évaluation du risque écotoxicologique d'un sol contaminé par l'As pourrait être surestimé. En effet, la fraction soluble de l'As dans le sol a une importance majeure du point de vue écologique, étant la fraction la plus susceptible d'influencer la biodisponibilité et, par la suite, la toxicité de l'As pour les organismes vivants. De plus, elle est la fraction la plus susceptible de migrer dans les horizons plus profonds du sol tout en augmentant le risque de contamination de la nappe phréatique.

En général, la proportion de l'As soluble n'est pas corrélée avec la concentration totale de l'As du sol (Jones *et al.*, 1997; Turpeinen *et al.*, 2002). Par exemple, d'après Turpeinen *et al.* (2002, 2003), la proportion d'As soluble des sols fortement contaminés par l'As en provenance de sites d'imprégnation du bois par le CCA était très faible, soit comprise entre 0,1% et 0,3 %. La solubilité de l'As dans le sol dépend plutôt de la spéciation de l'As, des caractéristiques physico-chimiques du sol et du vieillissement de la contamination. Ainsi, la proportion d'As soluble est plus élevée dans les sols ayant un faible contenu en argiles et en oxydes de Fe et Al (Bhumbla et Keefer, 1994). On considère que la solubilité de l'As et par la suite sa biodisponibilité et toxicité dans le sol diminue en fonction du temps (Onken et Adriano, 1997; Turpeinen, 2002). Par exemple, Onken et Adriano (1997) ont conclu que la diminution de l'As(V) et l'As(III) solubles observée dans le sol pendant le temps était probablement due à leur conversion dans des formes insolubles. De plus, le taux de conversion de l'As soluble dans des formes insolubles était le même dans des sols saturés et non-saturés (pH=4,5).

Une corrélation positive et significative entre la concentration d'As totale soluble (des extraits aqueux) et la biodisponibilité de l'As chez la bactérie *Escherichia coli* MC 1061pTOO3 (utilisée comme bioindicateur) a été trouvée par Turpeinen *et al.* (2003) dans le cas des sols en provenance de sites d'imprégnation du bois par du CCA. Toutefois, la fraction biodisponible de l'As était comprise entre 3% et 77 % de la

concentration d'As soluble et variait selon le type de sol. Selon les mêmes auteurs, la biodisponibilité de l'As diminuait avec le vieillissement de la contamination.

Concernant les études sur le potentiel de mobilisation de l'As dans le sol, elles sont peu nombreuses (Jones, 1997; Ruokolainen *et al.*, 2000 ; Macur *et al.*, 2001). Par exemple, selon Ruokolainen *et al.* (2000), la mobilisation de l'As d'un sol contaminé par le CCA, était faible, soit environ 0,6 % pendant 6 mois.

La solubilité de l'As dans le sol peut être contrôlée par les mécanismes suivants: l'adsorption/désorption, la précipitation/dissolution et les réactions d'oxydoréduction. La compréhension de ces mécanismes sur la disponibilité de l'As soluble pendant le temps est d'une importance fondamentale lors de l'évaluation du risque écotoxicologique d'un sol contaminé par l'As (Turpeinen *et al.*, 2003).

#### **2.4.2.1 Adsorption de l'As dans le sol**

Le plus important mécanisme qui contrôle la solubilité de l'As dans le sol est le mécanisme d'adsorption/désorption (McGeehan et Naylor, 1994; Jones, 1998; Inskeep *et al.*, 2002). Le degré d'adsorption de l'As dans le sol dépend de plusieurs facteurs : le pH, le potentiel d'oxydoréduction (Eh), la présence des ions compétitifs dans la solution du sol et la force ionique.

##### **2.4.2.1.1 pH**

Le pH est un paramètre qui contrôle la solubilité de l'As dans le sol par son influence sur la rétention de l'As sur les (oxy)hydroxydes de Fe, Al et Mn et les argiles (Smith *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2002). On considère que le plus important mécanisme de rétention de l'As(V) et l'As(III) est l'adsorption spécifique (par la formation des complexes via un échange des ligands avec la surface hydrolysée) sur les oxydes de Fe, Al et Mn, dont le contenu augmente avec la profondeur du sol (Haw-Tarn Lin *et al.*, 2002; Inskeep *et al.*, 2002 ). Dans la gamme naturelle de pH du sol (5-8), l'importance de l'adsorption de

l'As sur les oxydes augmente dans l'ordre suivant : oxydes de Fe > oxydes d'Al > oxydes de Mn. On considère que l'adsorption de l'As(V) sur les oxydes est plus forte que l'adsorption de l'As(III) et qu'elle augmente avec la diminution du pH. Toutefois, dans des conditions de pH plus élevées, l'As(III) est plus adsorbé au sol que l'As(V) (Smith *et al.*, 1999; Golberg, 2002). En effet, l'adsorption maximale de l'As(III) sur les oxydes serait autour de pH=7-8 (Pierce et Moore, 1982; Dixit et Hering, 2003), tandis que pour l'As(V) l'adsorption maximale serait autour de pH=4 (Pierce et Moore, 1982).

Cependant, l'influence du pH sur l'adsorption de l'As dans le sol serait contrôlée par la teneur des sols en oxydes de Fe, Al et Mn. Ainsi, selon Smith *et al.* (1999) dans les sols avec un faible contenu en oxydes, l'augmentation du pH avait un moindre effet sur l'As(V) adsorbé, tandis que dans les sols avec une proportion élevée d'oxydes, l'adsorption de l'As(V) diminuait avec l'augmentation du pH. De plus, un facteur important dans la rétention de l'As(III) par rapport à l'As(V) sur les oxydes de Fe est le ratio As : Fe. Ainsi, l'As(III) est retenu moins fortement que l'As(V) sur les oxydes de Fe à un faible ratio As:Fe, tandis qu'à un grand ratio, l'As(III) est retenu plus fortement que l'As(V) (Manning *et al.*, 1998; Sun et Doner, 1998). En dépit du fait qu'en conditions aérobies, les oxy(hydroxydes) de Fe et Mn sont de forts adsorbants de l'As, en conditions réductrices, ils peuvent être responsables de la mobilisation de l'As dans le sol par leur dissolution réductive (Masscheleyn *et al.*, 1991; McGeehan et Naylor, 1994).

Une forte corrélation entre la concentration d'As et le contenu en argile du sol a été mise en évidence malgré la charge négative de la surface des argiles (Manning et Golberg, 1997). Toutefois, la rétention de l'As sur les argiles est plus forte dans les sols acides (Sadiq, 1997). Le mécanisme de rétention de l'As sur les argiles est relié aussi au pH. Les argiles sont chargées positivement à un pH < point de zéro charge du minéral et des attractions électrostatiques ont lieu entre l'As et la surface de l'argile. En général, les argiles ont une plus grande affinité pour l'As(V) que pour l'As(III) et leur rétention

maximale dépend du contenu des argiles, du type de minéraux et du pH (Manning et Golberg, 1996; Lin et Puls, 2000).

#### **2.4.2.1.2 Potentiel redox (Eh)**

La solubilité de l'As augmente, en général, avec la diminution du potentiel redox (Eh) du sol. Selon Masscheleyn *et al.* (1991), la solubilité de l'As dans le sol en conditions aérobies (200-500 mV) était faible, tandis qu'en conditions faiblement réductrices (0-100 mV), la solubilité de l'As augmentait suite à la dissolution réductive des (oxy)hydroxydes de Fe. En conditions fortement réductrices (-200 mV), la concentration de l'As soluble était 13 fois plus élevée qu'en conditions aérobies (500 mV).

#### **2.4.2.1.3 Force ionique**

La force ionique est un paramètre susceptible d'influencer la solubilité de l'As soluble dans le sol, par son influence sur le mécanisme d'adsorption de l'As. Selon Smith *et al.* (1999), l'adsorption de l'As(V) dans le sol augmentait avec la force ionique à un pH > 3, tandis que l'augmentation de la force ionique avait un moindre effet sur l'adsorption de l'As(III) au sol.

#### **2.4.2.1.4 Ions compétitifs**

La mobilité de l'As dans le sol est influencée par la présence de certains ligands inorganiques et organiques présents dans la solution du sol. Le ligand inorganique le plus important qui influence la mobilisation de l'As(V) est le phosphate. L'ajout de phosphate dans le sol augmente la mobilisation de l'As (V) par un échange anionique compétitif pour les sites de rétention à la surface des oxydes (Bhumbla et Keefer, 1994; Onken et Hossner, 1995). Selon Chen (1994), en présence d'anions dans la solution, la concentration de l'As(V) soluble augmente dans l'ordre suivant : phosphate  $\geq$  sulfate > nitrate  $\sim$  chlorure. De plus, la rétention de l'As dans le sol est reliée à la concentration de phosphate ajoutée au sol, mais elle n'est pas reliée aux variations des concentrations de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  (Bhumbla et Keefer, 1994). En général, des concentrations élevées en

ions chlorure, nitrate et sulfate dans les sols salins ont un faible effet sur la rétention de l'As (Yan-Chu, 1994).

Dans des sols ayant une capacité d'adsorption faible, l'effet compétitif du phosphate est plus évident que dans le cas des sols avec une capacité d'adsorption d'As élevée. Selon Smith *et al.* (2002a), la rétention de l'As en présence de phosphate dépend du contenu en oxydes de Fe du sol. La présence d'ions phosphate dans la solution du sol diminuait la rétention de l'As(V) dans le sol contenant un faible proportion d'oxydes de Fe (<100 mmol/kg), tandis que dans le cas de sols riches en oxydes de Fe (> 800 mmol/kg), l'effet des ions phosphate sur la rétention de l'As était faible. Dans ce dernier cas, la mobilité de l'As(V) a augmenté avec la concentration de phosphate. Un effet similaire, a été observé aussi, dans le cas de la rétention de l'As(III). De plus, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la solution du sol augmentait l'adsorption de l'As(V) au sol, beaucoup plus que la présence de  $\text{Na}^+$ . La même tendance a été observée dans le cas de l'As(III), mais son effet sur son adsorption a été plus faible.

D'autres anions compétitifs importants susceptibles d'augmenter la mobilisation de l'As par un effet de compétition pour les sites de rétention du sol sont les substances organiques solubles sous la forme de carbone organique dissous (COD) (Kalbitz et Wennrich, 1998 ; Grafe *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002). Généralement, la capacité du COD à mobiliser l'As dépend de la nature de la matière organique, de la forme chimique de l'As et de la concentration des adsorbants présents. Selon Kalbitz et Wennrich (1998), le COD devrait être un paramètre important dans l'étude du potentiel de mobilisation de l'As dans le sol. Une corrélation positive a été trouvée ( $r = 0,89$ ,  $n=12$ ,  $p < 0,001$ ) entre la mobilisation de l'As dans le sol et le COD des eaux interstitielles du sol. De plus, selon Grafe *et al.* (2001) les substances organiques dissoutes (COD) pourraient être responsables de la mobilisation de l'As, même dans un sol contenant des oxydes de fer. Redman *et al.* (2002) dans le cadre d'une étude menée sur des échantillons d'eau contaminés par l'As et contenant de l'hématite ont mis en

evidence que la matière organique dissoute influençait plus la mobilisation de l'As(III) que de l'As(V).

La matière organique dissoute (COD) est également un paramètre qui pourrait gouverner l'adsorption de l'As par rapport au pH. En effet, selon Lin *et al.* (2002) l'adsorption de l'As (V) dans le sol était liée au pH en absence de COD, tandis qu'en présence de COD son adsorption n'était pas contrôlée par le pH.

L'As a une très faible affinité pour la formation des complexes organiques dans le sol à cause de la charge négative des molécules organiques et des anions d'As (Sadiq, 1997).

#### **2.4.2.1.5 Matière organique**

À ce jour, l'influence de la matière organique sur la rétention de l'As dans le sol fait l'objet d'avis contradictoires (Bhumbla et Keefer, 1994). Ainsi, selon Lund et Fobian (1991), il y a une corrélation positive entre le contenu du carbone organique total (COT) et l'adsorption de l'As dans le sol, tandis que Cai *et al.* (2002) n'ont pas trouvé de corrélation significative entre la matière organique du sol et la concentration de l'As dans le sol. Aussi, selon les travaux de Balasoiu *et al.* (2001) la rétention de l'As dans les sols artificiels contaminés par le CCA de type C n'était pas influencée par la teneur en matière organique des sols comprise entre 0,5 % et 15 %, à un pH égal à 5,5.

En effet, les composantes de la matière organique du sol susceptibles d'être impliquées dans la rétention de l'As sont les acides humiques. Jusqu'à présent, la rétention de l'As sur les acides humiques a été mise en évidence dans des suspensions. En général, les acides humiques retiennent plus d'As(V) que d'As(III) et la rétention dépend du pH. Ainsi, la rétention de l'As(V) sur les acides humiques est maximale à pH = 5,5 tandis que la rétention de l'As(III) a lieu à des pH > 8,5 (Smith *et al.*, 1998). Aussi, une matière organique ayant un contenu élevé en azote est susceptible d'avoir une plus grande capacité d'adsorption de l'As due aux charges positives des composés aminés



(Cornu *et al.*, 1999; Saada *et al.*, 2003). Cependant, lorsque le pH augmente, les acides humiques deviennent plus solubles et leur capacité à retenir l'As diminue (O'Neill, 1995). D'autre part, la fraction de la matière organique soluble à tous le pH, soit les substances fulviques, serait reliée à la mobilisation de l'As dans le sol (Xu *et al.*, 1991; Grafe *et al.*, 2001).

En conclusion, l'influence de la matière organique du sol sur la rétention de l'As ne fait encore pas l'objet d'un consensus. Par opposition, la fraction dissoute de la matière organique du sol, sous la forme de COD, est susceptible d'augmenter la solubilité et par conséquent la mobilité de l'As dans le sol par un effet de compétition ou d'inhibition de la rétention de l'As dans le sol. Néanmoins, étant donné que la plupart des études portant sur ce sujet ont été menées dans des suspensions, plus de recherches sont encore nécessaires pour valider cette conclusion dans le cas de sols contaminés par l'As. De plus, le COD est considéré la fraction de la matière organique utilisée comme substrat de carbone facilement biodégradable pour la respiration microbienne du sol (Jandl et Sollins, 1997; Neff et Asner, 2001). Par exemple, une corrélation positive entre le carbone organique extrait avec de l'eau et le carbone organique total minéralisé a été trouvée par Burford et Bremner (1975) ( $r^2=0,97$ ). Par ailleurs, étant donné que le changement dans le carbone organique total n'est pas détectable dans un court laps de temps (essais de laboratoire), le suivi de COD dans la solution du sol semble être une méthode sensible pour évaluer la minéralisation de C dans le sol. Toutefois, il n'est pas possible de faire la distinction entre l'incorporation microbienne de COD et la minéralisation (Merckx *et al.*, 2001; Marschner et Kalbitz, 2003). De plus, une concentration plus élevée de COD dans le sol pourrait stimuler la croissance microbienne et par la suite le taux de réduction de l'As(V) dans le sol. Aux vues de ces conclusions, le COD a été proposé comme un paramètre important à suivre dans le cadre de ce projet.

#### 2.4.2.2 Précipitation de l'As dans le sol

Les mécanismes de précipitation/dissolution de l'As dans le sol ont une moindre importance dans le contrôle de la solubilité de l'As dans le sol par rapport aux mécanismes d'adsorption/désorption (Jones *et al.*, 1997).

En général, dans des conditions aérobies ( $pe+pH > 10$ ), les formes solides d'As(V) les plus importantes sont formées par les hydroxydes de Fe, Al et Ca. Selon les isothermes de solubilité de minéraux de l'As(V) dans les sols, la formation du  $FeAsO_4$  et  $AlAsO_4$  est favorisée dans des conditions acides ( $pH < 5$ ), tandis que la formation des minéraux avec Ca, soit  $(Ca_3(AsO_4)_2)$ , est favorisée dans des conditions alcalines. Ainsi, dans les sols, en conditions aérobies et alcalines, les sels d'As(V) avec Fe, Ca, Mn, Mg ou Al sont considérés trop solubles pour que la précipitation contrôle la concentration de l'As (V) à l'équilibre dans le sol (sauf peut être pour des concentrations d'As(V) soluble très élevées) (Jones *et al.*, 1997; Sadiq, 1997).

Dans des conditions anaérobies ( $pe+pH < 6$ ), la forme solide d'As(V) la plus importante est l'arsenopyrite ( $FeAsS$ ). Pour l'As(III), les phases solides les plus stables sont le  $Fe_3(AsO_4)_2$  et les sulfures de l'As(III), soit l'orpiment ( $As_2S_3$ ) et le réalgar ( $AsS$ ). Le  $Fe_3(AsO_4)_2$  est la forme la plus stable en conditions anaérobies, mais il peut se former aussi dans des conditions aérobies. Toutefois, plus le Eh augmente, plus la stabilité de  $Fe_3(AsO_4)_2$  diminue (Sadiq, 1997).

#### 2.4.2.3 Activité microbienne

Outre la réduction biologique de l'As(V) en As(III), susceptible d'entraîner la mobilisation de l'As dans le sol, une forte activité microbienne du sol pourrait être aussi responsable de la mobilisation de l'As par un mécanisme indirect, soit par une diminution du potentiel redox du sol.

Turpeinen *et al.* (1999) ont montré que la présence des micro-organismes a induit une mobilisation de l'As (majoritairement sous forme d'As(V)) dans des sols fortement contaminés par l'As en provenance de sites d'imprégnation du bois par le CCA, et ceci était plus intense en présence d'une source de carbone facilement biodégradable. En effet, à part d'un changement de la spéciation de l'As soluble pendant le temps, les micro-organismes déterminaient une mobilisation de l'As(V), d'environ 6 % par rapport aux sols abiotiques, pendant 10 jours d'incubation. De plus, avec un ajout d'une source supplémentaire de carbone (glucose, 0,2%-1%) les micro-organismes déterminaient une plus grande mobilisation de l'As, soit 19%-24 % par rapport aux sols abiotiques, tant en conditions aérobies qu'anaérobies.

### CHAPITRE III

## CONSTITUTION ET CONTAMINATION DE SOLS SYNTHÉTIQUES PAR UNE SOLUTION DE CCA

### 3.1 Introduction

Afin d'évaluer l'influence de la teneur en matière organique du sol sur la spéciation de l'As, quatre sols synthétiques contaminés par du CCA de type C ont été utilisés dans le cadre du projet. En effet, comme l'indique le plan expérimental illustré sur la figure 3.1, la première étape visait la constitution des sols synthétiques. Avant de procéder à la constitution des sols, la source de la matière organique des sols a été choisie suite à une caractérisation chimique de deux sources de carbone, soit de la tourbe et du fumier de poulet composté. Après la caractérisation physico-chimique des sols, on a procédé à leur contamination par une solution de CCA et ensuite, une caractérisation physico-chimique des sols contaminés a été effectuée. Les quatre sols synthétiques contaminés ont été utilisés dans le cadre des essais en macrocosmes (décrits dans le chapitre IV) en vue d'évaluer l'influence de la teneur en matière organique sur la spéciation de l'As dans le sol.

L'utilisation de sols synthétiques dans le cadre expérimental a permis de faire varier la teneur de la matière organique, la teneur des autres composants du sol (kaolinite et limon) demeurant constante. En conséquence, la rétention de l'As aux sols et sa partition solide-liquide devrait être gouvernée par un seul composant du sol, la matière organique. Sachant que la spéciation de l'As dans le sol peut être influencée par plusieurs fractions de la matière organique (y compris la fraction solide), la matière organique des sols artificiels a été choisie afin qu'elle ait une nature plus complexe, soit plus proche d'une matière organique naturelle (composée de plusieurs fractions de carbone avec différents degrés de décomposition). Jusqu'à date, l'influence d'une source de carbone sur la spéciation de l'As a été étudiée uniquement dans la phase

soluble et en présence d'une source de carbone facilement biodégradable, qui est le glucose (Turpeinen *et al.*, 2002).

Ce chapitre présente en première partie une synthèse des protocoles utilisés pour la constitution des sols artificiels, la caractérisation de la matière organique des sols artificiels, la contamination des sols par le CCA et la caractérisation physico-chimique des sols contaminés. La seconde partie présente les résultats obtenus suite à la caractérisation de la matière organique et à la caractérisation des sols synthétiques contaminés.

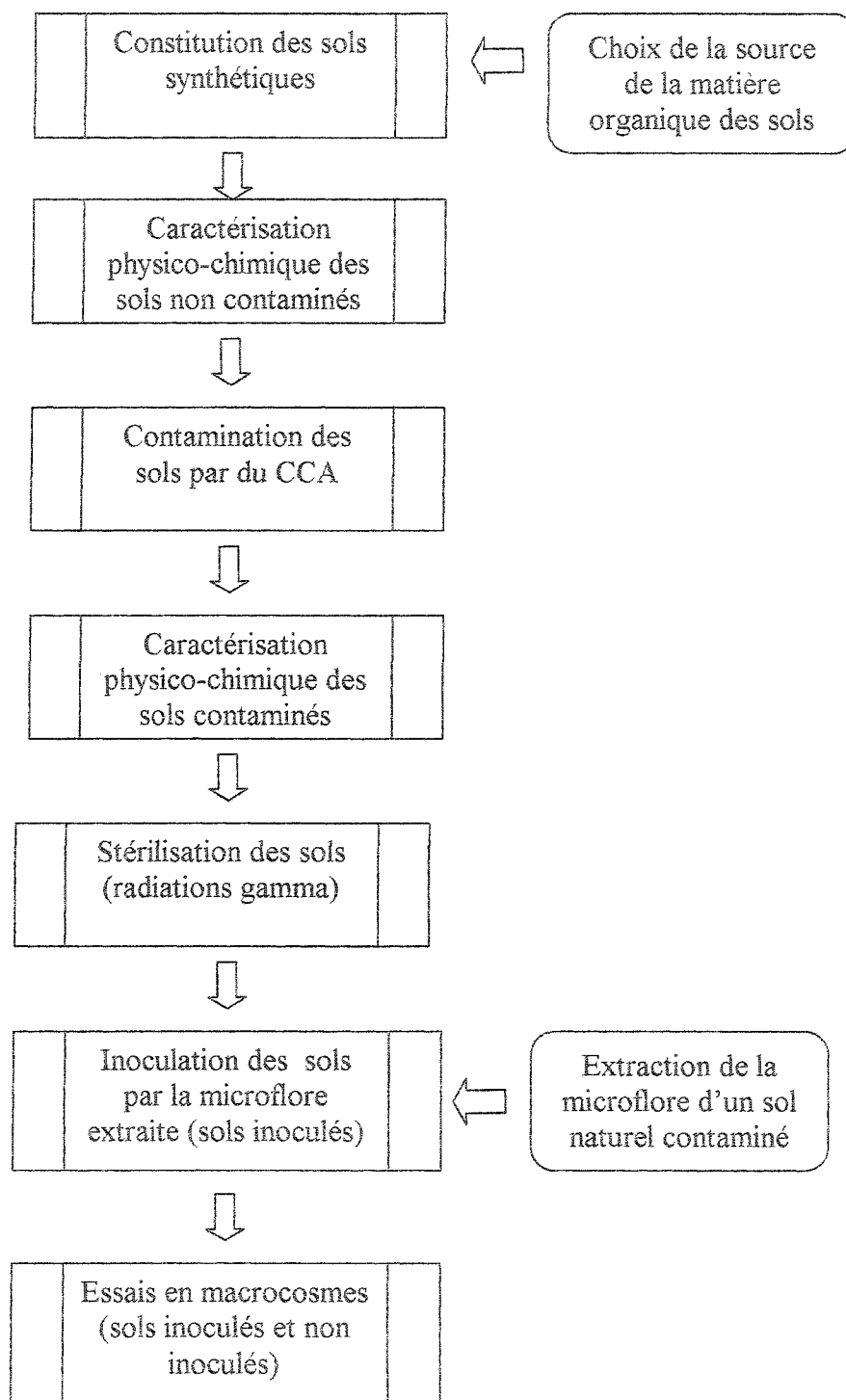


Figure 3.1 Plan expérimental du projet

## 3.2 Matériel et Méthodes

### 3.2.1 Constitution des sols synthétiques

La constitution des 4 sols synthétiques (A, B, C, D) a été réalisée selon les protocoles expérimentaux P54-A et P35-A présentés à l'Annexe A. Les composantes des sols synthétiques sont la kaolinite EPK (de Sial Québec), le limon, le sable (Ottawa) et la matière organique.

Selon la caractérisation chimique donnée par le fournisseur, les principaux oxydes présents dans la kaolinite EPK étaient les oxydes de silicium  $\text{SiO}_2$  (46,5 % p/p) et d'aluminium  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (39,49 % p/p). Le contenu en oxydes de Fe, un composant important d'un sol dans l'adsorption de l'As, était faible, soit autour de 0,8 % (p/p). De plus, les oxydes de Mn n'étaient pas détectables. Le limon qui contenait 98 % de particules  $< 75 \mu\text{m}$  et 2 % d'argile ( $< 2 \mu\text{m}$ ), a été obtenu par tamisages successifs de la fraction  $< 2 \text{ mm}$  d'un sol de base, sans matière organique, en provenance de la Baie James. L'analyse granulométrique du sol de base a été déterminé selon la méthode D-2487-98 (ASTM, 2000). Suite à la caractérisation de la matière organique (section 3.2.2), on a choisi d'utiliser un mélange de tourbe et de fumier de poulet composté (30 %:70 %) (p/p), et tamisé à un diamètre inférieur à 1 mm. En vue d'évaluer le rôle de la teneur en matière organique sur la spéciation de l'As dans le sol, on a fait varier la teneur en matière organique des sols de 0,5 % à 15 %. Les autres composants des sols sont 5 % de kaolinite, 25 % de limon et 55-69,5 % de sable. La composition des sols synthétiques ainsi préparés est présentée au Tableau 3.1.

**Tableau 3.1 Composition des sols synthétiques**

Composants	Sol A	Sol B	Sol C	Sol D
(% p/p)				
Matière organique	0,5	5	7,5	15
Kaolinite	5	5	5	5
Limon	25	25	25	25
Sable	69,5	65	62,5	55

Afin d'obtenir des sols homogènes, les sols synthétiques ont été constitués par fractions de 150 g et agités pendant 24 h dans un agitateur rotatif à 50 rpm. Environ 1,8 kg de chaque sol synthétique ont été constitués. Par la suite une caractérisation physico-chimique des sols a été effectuée.

### 3.2.2 Caractérisation de la matière organique

Dans le but de choisir la source de matière organique des sols artificiels, on a caractérisé deux sources potentielles de matière organique, soit, la tourbe de sphaigne (Jardinière, Québec) et le fumier de poulet composté (Fertilo de Fafard, Québec). Les deux matériaux organiques ont été d'abord tamisés à un diamètre inférieur à 1 mm puis conservés dans des seaux en plastique à 4°C. La caractérisation physico-chimique a été réalisée selon les protocoles expérimentaux présentés à l'Annexe B. Les analyses effectuées ont été les suivantes : le COT (carbone organique total), le TKN (l'azote total Kjeldahl), l'azote ammoniacal, le pH, la teneur en matière organique (% de solides volatils à 550 °C), l'extraction alcaline des substances humiques, le contenu de substances facilement disponibles (SFD), le carbone organique dissous (COD), ainsi que la mesure spectrophotométrique du COD. Les trois premiers paramètres ont été analysés par un laboratoire externe (Services Analytiques Philips). Une brève description des méthodes d'analyse est présentée à la section suivante.



### **Teneur en matière organique (% de solides volatils à 550 °C)**

La teneur en matière organique, exprimée par la teneur en solides volatils a été déterminée par séchage préalable des échantillons à 105 °C et par combustion à 550 °C pendant un minimum de 16 heures, selon le protocole P33-A (Karam 1993). Par cette méthode le pourcentage de cendres a d'abord été déterminé, puis le pourcentage de solides volatils a été calculé.

### **Teneur en carbone organique total, en azote et en phosphore**

Le carbone organique total (COT), l'azote total Kjeldahl (NTK) (Standard Methods, 4500-Norg), l'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>) (Standard Methods, 4500-NH<sub>3</sub>.F), et le phosphore total (P) (Standard Methods, 4500-PE) ont été déterminés par un laboratoire externe (Philip Services Analytiques) sur des échantillons tamisés et séchés à l'air pendant 24 heures.

### **pH**

La mesure du pH dans une suspension de 1:16 (composé organique: eau déionisée) a été réalisée selon le protocole 35-F (méthode ASTM D 2976, 1996) à l'aide d'un pH-mètre, Accumet model AR 25.

### **Contenu en eau**

Le contenu en eau a été déterminé par séchage à 105 °C, selon le protocole A7 (Annexe A) (ASTM D22 16-92 et ASTM D2974-87).

### **Substances humiques (SH)**

En général, la fraction majoritaire de la matière organique d'un sol (65-75 %) est représentée par les matières humiques (MH) (acides fulviques, acides humiques et humines) qui est la fraction la plus récalcitrante à la décomposition. Le reste de la matière organique du sol est composé de substances non-humiques qui est la fraction plus facilement décomposable par les microorganismes du sol (Essington, 2004). La

séparation des matières humiques en substances humiques (SH) (acides humiques et acides fulviques) et humines (H) a été réalisée selon les protocoles expérimentaux P35-D et P54-B de l'Annexe B et repose sur deux extractions successives par une solution de NaOH 0,5 M. Cette étape a lieu après l'enlèvement des débris par acidification avec du HCl 0,5 M. Ensuite, la séparation des substances humiques en fractions fulviques (FF) (un mélange des acides fulviques et substances non-humiques) et acides humiques (AH) a lieu par acidification des substances humiques avec une solution de HCl 6 M (pH =1,5). Les acides humiques se retrouvent sous forme de précipité et les fractions fulviques sous une forme soluble. Suite à l'extraction alcaline, des paramètres qui décrivent l'humification des matériels organiques ont été calculés, soit le pourcentage d'acides humiques ( $100 \cdot \text{AH}/\text{SH}$ ) et le ratio d'humification HR ( $\text{HR} = \text{AH}/\text{FF}$ ) (Chefetz *et al.*, 1996 ; Hsu et Lo, 2001).

#### **Carbone organique dissous (COD) et absorptivité de masse spécifique (MSA)**

L'objectif de cette analyse est de déterminer la fraction de la matière organique qui est la plus disponible pour les microorganismes. En effet, le carbone organique dissous (COD) est une sous-fraction du carbone organique total (COT) et peut être une source importante de carbone à court terme pour les microorganismes (Jandl et Sollins, 1997 ; Nguyen, 1999 ; Pascual *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2000). Ainsi, une corrélation positive ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=11$  composts), entre le COD et le  $\text{CO}_2$  libéré par la minéralisation a été trouvée par Wu *et al.* (2000). Cette fraction serait la plus biodisponible une fois le compost appliqué au sol (Hsu et Lo, 2001). La détermination du COD a été réalisée selon le protocole P54-C présenté en Annexe B. Elle débute par une extraction des substances solubles avec de l'eau déionisée à un taux matériel organique : eau déionisée de 1:10 et ceci pendant 2 h. Ensuite, l'extrait est filtré sur une membrane en nitrate de cellulose de porosité de  $0,45 \mu\text{m}$  et le COD du filtrat est déterminé en analysant le COT par combustion et détection de  $\text{CO}_2$  libéré par infrarouge (Méthode Standard 5310 B). La limite de détection du COT dans le filtrat était de  $0,05 \text{ mg/l}$ .

L'absorptivité de masse spécifique (MSA), égale à l'absorbance du COD à 420 nm par unité de concentration de COD, est un paramètre qui reflète le degré d'humification du COD. Selon Wu *et al.* (2000), l'analyse spectrophotométrique du COD est une analyse prometteuse pour déterminer la stabilité/maturité d'un compost. Dans le but de calculer le paramètre MSA, l'absorbance du COD a été déterminée sur un autre aliquot du filtrat, à une longueur d'onde de 420 nm. Le paramètre MSA a été calculé selon la relation suivante :

$$MSA = A/c \times l, \text{ (L/mg} \cdot \text{m)}$$

où,

A : absorbance lue au spectrophotomètre (modèle Varian Cary 100 Bio)

c : concentration de COT de l'extrait filtré (COD), mg/L

l : longueur de la cellule en quartz (m)

### **Substances facilement disponibles (SFD)**

Étant donné que dans la littérature il n'existe pas encore de consensus concernant un paramètre chimique fiable qui prédirait à lui seul le potentiel de dégradabilité d'un matériel organique, un autre paramètre qui refléterait la dégradabilité a été déterminé, soit la proportion de substances facilement disponibles (SFD). Les SFD représentent la fraction organique d'un substrat qui peut être utilisée facilement par les microorganismes, et est équivalente à la « fraction biodégradable » (Prasad *et al.*, 1999). Cette fraction (composée des sucres solubles, de l'hémicellulose, des aminoacides et des protéines) a été déterminée selon le protocole P54-D, développé à partir d'une version simplifiée de la méthode « Forage Fibre Analysis ». Cette méthode est largement utilisée dans le domaine agronomique pour évaluer la dégradabilité d'un matériel organique (Goering et Van Soest, 1970; Prasad *et al.*, 1999). La procédure repose sur l'enlèvement, en premier lieu, des résines par un lavage avec de l'acétone 90 % (v/v) et ensuite en une extraction de la fraction SFD avec du HCl 5% par chauffage à reflux pendant 2 h.

### 3.2.3 Contamination des sols synthétiques

Les sols ont été contaminés artificiellement par une solution commerciale de CCA de type C ayant une concentration de 61 % (p/p). La proportion réelle en oxydes de la solution était de 34,7 % en  $\text{As}_2\text{O}_5$ , 47 % en  $\text{CrO}_3$  et 18,1 % en  $\text{CuO}$ . La contamination des sols a été réalisée après la mesure du pH des sols, selon la procédure de contamination développée par Balasoiu *et al.* (2001) (voir le protocole P 35-H à l'Annexe A). Tous les sols ont été contaminés par la même quantité de CCA-C, pour une concentration finale de 2665 mg/kg sol sec. Ainsi, les concentrations théoriques en métaux appliquées aux sols étaient: 980 mg As/kg sol sec, 627 mg Cu/kg sol sec et 1058 mg Cr/kg sol sec. La procédure de contamination a été réalisée en trois étapes: le pré-traitement, le contact avec agitation (24 heures) et le contact sans agitation (120 heures). En vue de contaminer toute la quantité de sol dans la même journée, les sols ont été contaminés par fractions de 150 g de sol sec, à un ratio sol: liquide de 1:1,66, au lieu de le faire par fractions de 100 g, à un ratio sol: liquide de 1:2,50 conformément au protocole original de contamination.

La rétention des métaux en fonction du temps a été évaluée après 4, 24, 48 et 120 heures de contact pendant l'étape sans agitation, en analysant les concentrations d'As, de Cr et de Cu dans 10 ml de solution filtrée (0,45  $\mu\text{m}$ ) (voir le Tableau D1 à l'Annexe D). Après la période de contamination, les suspensions de sol ont été centrifugées et séchées à l'air pendant 2 jours. Ensuite, les sols ont été homogénéisés par agitation (50 rpm) pendant 24 h. Les sols contaminés ont été conservés dans des seaux en plastiques à 4 °C.

Les sols ont été caractérisés après la contamination au CCA. Le pH a été vérifié pour s'assurer qu'il n'y avait pas eu de diminution importante après contamination avec la solution acide de CCA. Le pH du sol A ayant diminué significativement, un ajustement du pH a été réalisé par ajout de carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$ , selon le protocole P35- G présenté en Annexe A. Ensuite, la teneur en solides volatils et le carbone organique dissous (COD) ont été déterminés.

### 3.2.4 Caractérisation physico-chimique des sols synthétiques

#### pH

Il était prévu de maintenir le pH des sols, après contamination, à une valeur proche de la neutralité. À un tel pH, la rétention de l'As(V) (la forme chimique de l'As présente dans la solution de CCA commerciale), ne devrait pas être très élevée dans les sols, et en conséquence l'As serait assez soluble pour qu'il soit plus disponible aux éventuelles transformations redox. D'autre part, un pH proche de la neutralité a été envisagé pour assurer des conditions optimales pour l'activité de microorganismes inoculés dans des sols (Allison, 1973). Dans cette optique, le pH des sols a été mesuré, dans des suspensions sol /eau déionisée 1:4, après 48 h, à l'aide du pH mètre Accumet model AR 25, selon le protocole P35-F (méthode ASTM D 4972-95a).

#### Teneur en As

La concentration de l'As total des sols contaminés (et non contaminés, voir section 3.2.1) a été déterminée, par trois extractions successives de 1 g sol avec 10 ml de HCl 10 M, pendant 30 minutes. Les surnageants obtenus après centrifugation ont été filtrés sur des filtres en fibre de verre Whatman (0,7 µm). Les filtrats ont été ensuite dilués à 100 ml avec de l'eau déionisée (Balasoiu *et al.*, 2001). La concentration de l'As de l'extrait a été analysée par un laboratoire externe (Philips) par spectroscopie d'absorption atomique couplée à une source de plasma à couplage inductif (ICP-AES). La limite de détection rapportée était de 0,001 mg/l.

#### Teneur en Cu et en Cr

Les concentrations totales de Cu et de Cr des sols ont été déterminées par digestion totale sur une plaque chauffante, de 1,4 g sol avec un mélange d'acides concentrés HNO<sub>3</sub> (70 % p/v), HClO<sub>4</sub> (70 % p/v) et HF (48 % p/v) dans une proportion de 0,75 : 1 : 0,05. La solution obtenue après digestion totale a été filtrée sur des filtres Whatman (0,7µm) et diluée à 100 ml avec de l'eau déionisée (Balasoiu *et al.*, 2001). Les

concentrations de Cu et Cr de la solution ont été analysées par un laboratoire externe (Philip) par ICP-AES. Les limites de détection rapportées pour le Cu et le Cr étaient de 0,001 mg/l, et 0,002 mg/l respectivement. Pour les analyses des concentrations totales de l'As, du Cu et du Cr, un blanc procédural a été réalisé. Toute la verrerie utilisée a été lavée à l'acide nitrique 10 % et rincée avec de l'eau distillée et déionisée, et parallèlement avec les analyses de l'As, Cr et Cu, le poids sec des sols a été déterminé selon la méthode décrite dans la section 3.2.1.

### **3.3 Résultats et discussion**

#### **3.3.1 Caractérisation de la matière organique**

La caractérisation chimique de la tourbe et du fumier de volaille composté a été effectuée en vue de choisir la source de matière organique à inclure dans les sols synthétiques. Ainsi, ce choix a été fait selon deux types des paramètres : des paramètres qui caractérisent la dégradabilité du C organique et des paramètres qui reflètent le contenu en nutriments. Les résultats de la caractérisation chimique sont présentés dans le Tableau 3.2 et sont rapportés au poids sec du matériel organique.

Les teneurs en solides volatils (%), ainsi que le COT indiquent que la tourbe est un matériel organique plus riche en matière organique (98 % solides volatils et  $490 \pm 4$  g/kg COT) par rapport au fumier de volaille composté (60 % solides volatils et  $280 \pm 0$  g/kg COT). Les valeurs du pH indiquent que la tourbe est un matériel organique acide, tandis que le fumier a un pH très proche de la neutralité.

Les résultats de l'extraction alcaline montrent que la fraction majoritaire de la matière organique des deux matériels analysés est constituée des matières humiques (MH) ( $\geq 80$  %), la fraction la plus récalcitrante à la décomposition. Toutefois, le fumier contient une fraction plus élevée de débris (D), plus facilement décomposables, soit environ 20 % par rapport à 5 % pour la tourbe. Suite à la séparation des matières humiques (MH) en

humines (H) et substances humiques (SH), les résultats montrent que dans la tourbe, la fraction majoritaire des matières humiques (MH) est constituée par la fraction insoluble de la matière organique, soit les humines (H), tandis que dans le fumier, elle est formée par les substances humiques (SH). Une caractérisation plus approfondie des substances humiques (SH) et de leur stabilité et maturité a été réalisée en séparant les substances humiques en acides humiques (AH) (la fraction de la matière organique soluble à pH basique) et fractions fulviques (FF) (la fraction de la matière organique soluble à tous le pH). Le faible pourcentage de fractions fulviques (FF), le pourcentage élevé d'acides humiques, ainsi que le grand ratio d'humification HR, indiquent que ces composés sont stables. En général, plus la fraction des acides humiques augmente par rapport à la fraction fulvique, plus le composé est stable (Chefetz *et al.*, 1996 ; N'Dayegamiye *et al.*, 1997).

Les faibles valeurs de COD pour le fumier de volaille (3,3 g/kg) et la tourbe (1,0 g/kg) indiquent aussi que les deux matériels organiques sont des composés stables. Ainsi, selon Wu *et al.* (2000), le fumier de volaille est mature, lorsque sa valeur de COD reste inférieure à la plage 10-17 g/kg. De plus, la valeur du MSA du fumier de volaille (0,82 L/mg\*m) légèrement supérieure à celle de la tourbe (0,28 L/mg\*m), indique que le COD du fumier est un peu plus humifié. En ce qui concerne les substances facilement disponibles (SFD), leurs concentrations sont très proches, soit 37,3 % pour la tourbe et 36,4 % pour le fumier de volaille. Cela indique que les deux matériels organiques sont presque identiques du point de vue de leur teneur en sucres solubles, hémicellulose et protéines.

Suite à la caractérisation des paramètres reliés à la prédiction de la dégradabilité du C organique, on peut conclure que les deux matériels organiques soit la tourbe et le fumier de volaille composté, sont de stabilités équivalentes et présentent des potentiels de dégradabilité similaires.

En ce qui concerne le contenu en carbone organique (COT), la tourbe est 2 fois plus riche en COT que le fumier. Par opposition, le fumier est plus riche en azote (d'environ 3 fois), en phosphore (environ 148 fois) et en azote ammoniacal (environ 2 fois), une des sources importantes d'azote pour les microorganismes (Hadas et Portnoy, 1994). En général, le rapport C/N est considéré comme un paramètre important dans la prédiction du taux de décomposition d'un matériel organique, un rapport C/N =6-10 est considéré comme un matériel facilement décomposable (Prasad *et al.*, 1999). Selon le rapport C/N, la tourbe serait moins facilement décomposable. De plus, la tourbe est caractérisée par un manque d'azote (C/N égale à 63,6) par rapport au fumier (C/N égale à 11). Étant donné que les deux matériels organiques sont proches au niveau de leur stabilité et surtout au niveau de leur stabilité à court terme, le choix de la matière organique des sols a été fixé en fonction de la valeur nutritive des matériels organiques. Cette valeur nutritive est importante dans la mesure où elle va permettre de soutenir l'activité ultérieure des micro-organismes inoculés dans les sols. En conséquence, selon un calcul théorique, on a choisi comme source de matière organique un mélange de tourbe et de fumier de volaille composté, dans une proportion de 30 % :70 % (poids sec/poids sec). L'utilisation de ce mélange comme source de matière organique du sol permet d'assurer un rapport C/N des sols autour de 15. Cette valeur est comprise dans l'intervalle de C/N = 9-24, retrouvée dans les sols naturels (Reddy *et al.*, 1981 ; Cook et Allan, 1992 ; Kalbitz et Geyer, 2002 ). De plus, l'utilisation de ce mélange comme source de matière organique du sol donnerait une matière organique similaire à des sols naturels, soit peu biodégradable.



**Tableau 3.2 Propriétés chimiques de la tourbe et du fumier de poulet**

Paramètres	Tourbe	Fumier de volaille
Solides volatils <sup>a</sup> (%)	98 ± 0,1	60 ± 0,2
pH	4,1	6,5
COT <sup>b</sup> (g/kg)	490 ± 4	280 ± 0
C/N <sup>b</sup>	67 ± 4	11 ± 0
<i>Nutriments</i>		
NTK <sup>b</sup> (g/kg)	7,7 ± 0,0	25 ± 0,0
N – NH <sub>4</sub> <sup>b</sup> (g/kg)	0,72 ± 0,0	1,3 ± 0,0
P t <sup>b</sup> (g/kg)	0,14 ± 7,0	20 ± 0
<i>Substances humiques</i>		
Matières humiques (MH) (%)	95	80
Débris (D) (%)	5	20
Humines (H) <sup>b</sup> (%)	74 ± 1,8	35 ± 26
Acides humiques AH <sup>b</sup> (%)	19,3 ± 13,2	40,6 ± 7,3
Fraction fulviques FF <sup>b</sup> (%)	1,9	4,4
Substances humiques (SH) (%)	21,2	45
Ratio d'humification (HR)	10,1	9,2
<i>Dégradabilité</i>		
COD <sup>a</sup> (g/kg)	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,5
MSA <sup>a</sup> (L/mg*m)	0,28 ± 0,04	0,8 ± 0,1
SFD <sup>b</sup> (g/kg)	376 ± 0,10	362 ± 3

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type, (n=3)<sup>b</sup> : moyenne ± RPD (%), (n=2)Le RPD % représente le pourcentage d'écart par rapport à la moyenne ( $|x_1 - x_2| * 100 / \bar{x}$ )

### 3.3.2 Caractérisation physico-chimique des sols synthétiques

Les valeurs des paramètres physico-chimiques des sols non contaminés (NC) et contaminés (C) sont présentées au Tableau 3.3. Les sols non-contaminés (NC) sont faiblement acides, ayant un pH compris entre 6,3 et 6,6 (pH moyen des sols était de  $6,4 \pm 0,1$ ). En conséquence, l'ajustement du pH des sols non contaminés n'a pas été nécessaire. Les concentrations des métaux dans les sols non contaminés sont très faibles par rapport aux concentrations appliquées, soit  $\text{As} < 2 \text{ mg/kg}$ ,  $\text{Cu} < 70 \text{ mg/kg}$  et  $\text{Cr} < 27 \text{ mg/kg}$ .

Après contamination, le pH du sol A a diminué de 0,7 unités, soit de  $6,3 \pm 0,02$  à  $5,6 \pm 0,2$ , tandis que le pH des autres sols a légèrement augmenté jusqu'à un pH proche de la neutralité. La diminution du pH du sol A est probablement due à sa faible capacité tampon étant donné son contenu très faible en matière organique (0,5 %). Afin de créer des conditions optimales de pH pour la biomasse inoculée ultérieurement, un ajustement du pH du sol A à  $7,0 \pm 0,1$  a été réalisé par l'ajout de 0,09 %  $\text{CaCO}_3$ . Ainsi, après contamination, le pH moyen des sols était près de la neutralité, soit  $6,9 \pm 0,1$ .

La concentration totale en As est plus élevée dans le sol minéral A ( $722 \pm 34 \text{ mg/kg}$ ), tandis que dans les sols organiques les concentrations sont légèrement plus faibles (de  $600 \pm 18$  à  $659 \pm 34 \text{ mg/kg}$ ). Ainsi, le pourcentage d'As retenu est plus élevé dans le sol minéral A, soit de 73,6 %, et la rétention de l'As dans les sols plus organiques (B, C et D) est plus faible (voir Tableau 3.4). On peut conclure que la teneur en matière organique n'a pas influencé la rétention de l'As dans le sol, le coefficient de détermination entre la teneur en matière organique (exprimée par % solides volatils) et la concentration totale d'As était très faible ( $r^2=0,36$ ,  $n=4$ ). La rétention de l'As similaire entre les sols organiques pourrait être expliquée par la présence même de la matière organique qui aurait pu bloquer les sites de rétention de l'As (Carey *et al.*, 1996).

**Tableau 3.3 Paramètres physico-chimiques des sols non contaminés (NC) et contaminés (C)**

Sol	pH <sup>a</sup>	As <sup>a</sup> (mg/kg)	Cu <sup>a</sup> (mg/kg)	Cr <sup>a</sup> (mg/kg)	Solides volatils <sup>b</sup> (%)	COD <sup>b</sup> (g/kg)
A (NC)	6,3 ± 0,0	< 0,3	58 ± 3	22 ± 3	-	-
A(C)	7,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	722 ± 34	402 ± 90	200 ± 72	1,3 ± 33	0,02 ± 6
B(NC)	6,4 ± 0,0	< 0,3	62 ± 2	21 ± 4	-	-
B(C)	7,0 ± 0,0	659 ± 34	661 ± 57	507 ± 26	5,5 ± 11	0,09 ± 14
C(NC)	6,6 ± 0,0	1 ± 1	63 ± 4	21 ± 3	-	-
C(C)	6,8 ± 0,0	600 ± 18	580 ± 29	607 ± 19	6,3 ± 10	0,16 ± 18
D(NC)	6,3 ± 0,0	1 ± 0	68 ± 1	26 ± 1	-	-
D(C)	6,8 ± 0,0	629 ± 28	587 ± 32	670 ± 153	11,0 ± 1	0,30 ± 4

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)

<sup>b</sup> : moyenne ± RPD (%) (n=2)

<sup>c</sup> : moyenne après l'ajustement du pH avec CaCO<sub>3</sub>

**Tableau 3.4 Pourcentage de métaux retenus <sup>a</sup> (après la digestion totale des sols)**

Sol	As (%)	Cr (%)	Cu (%)
A	73,6	16,8	54,9
B	67,2	45,9	95,5
C	61,2	55,3	82,4
D	64,2	61	82,7

<sup>a</sup> : (conc. totale dans le sol contaminé - conc. totale dans le sol non-contaminé)\*100 / conc. théorique appliquée)

En revanche, dans le cas du chrome, il existe une forte corrélation positive entre la concentration totale du Cr et la teneur en matière organique (% solides volatils) ( $r^2 = 0,83$ ,  $n=4$ ). Ainsi, selon les Tableaux 3.3 et 3.4, la concentration de Cr dans le sol minéral A est faible, soit de  $200 \pm 72$  mg/kg (rétention de 16,8 %), tandis que dans le sol le plus organique D elle est égale à  $670 \pm 153$  mg/kg (rétention de 61 %). La même tendance dans la rétention du Cr dans le sol était observée par Balasoiu *et al.* (2001)

dans une étude menée sur des sols synthétiques contaminés par du CCA-C. Dans le cadre de cette étude, suite à une évaluation de la répartition du Cr dans chacune des fractions de sol (par l'application d'une méthode séquentielle sélective) il a été montré que la moitié de la proportion du Cr retenu au sol était sous sa forme initiale de l'oxydation (hexavalente) après la contamination artificielle des sols par le CCA (environ 56 % du Cr était retrouvé dans la fraction liée aux oxydes et aux hydroxydes de Fe et Mn dans tous les sols, quelque soit la teneur en matière organique).

De plus, on remarque une compétition pour la rétention de l'As et du Cr dans les sols, l'As étant l'anion préférentiellement adsorbé. Cette conclusion est en accord avec l'étude de Khaodhiar *et al.* (2000) qui a montré que la présence de l'As(V) diminuait la quantité de chromate adsorbée dans un sol sableux contenant des oxydes de Fe, indiquant une compétition directe pour les sites de rétention et des effets électrostatiques. Également, on note que plus la teneur en matière organique des sols augmente, plus la compétition pour la rétention entre l'As et le Cr diminue, leur rétention étant presque similaire dans les sols plus organiques.

La rétention du Cu dans les sols a également augmenté avec la teneur en matière organique, soit de 54,9 % pour le sol A (0,5 % M.O) à 95,5 % pour le sol B (5 % M.O.). La forte rétention de Cu dans le sol B pourrait être reliée à une plus grande capacité d'échange cationique (CEC) du sol dû à une teneur en matière organique plus élevée. En effet, selon Balasoiu *et al.* (2001) la matière organique avait la plus grande contribution à la valeur de CEC d'un sol (pour la tourbe, la CEC était égale à 232 meq/100 g, tandis que pour la kaolinite elle était égale à = 38 meq/100g). Toutefois, on note que la rétention du Cu est influencée par une teneur en matière organique du sol comprise entre 0,5 % et 5 %, mais une teneur plus élevée, soit entre 5 % et 15 % n'a pas influencé la rétention de Cu dans les sols. Ainsi, une corrélation positive entre la teneur en matière organique du sol (% solides volatils) et la concentration de Cu du sol n'a pas été trouvée ( $r^2 = 0,38$ ,  $n=4$ ). D'une manière générale, on peut conclure que les sols plus organiques

ont retenu préférentiellement le Cu, et ensuite les anions, As et Cr. Les écarts type des concentrations totales des métaux dans les sols sont faibles, ce qui indique une bonne reproductibilité de la contamination artificielle et une bonne homogénéisation des sols.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Balasoiu *et al.* (2001) portant sur des sols synthétiques contaminés par le CCA-C, mais à un pH plus acide qui était de 5,5. Ainsi, la rétention de l'As dans les sols n'était pas influencée par la teneur en matière organique des sols (0,5% -15 %). Concernant le Cr, la même tendance a été observée : plus le sol est organique plus la rétention du Cr dans le sol est élevée. La rétention du Cu a augmenté aussi dans les sols ayant une teneur en matière organique allant de 0,5% à 7,5 %, tandis qu'une variation de la matière organique entre 7,5% et 15 % n'affectait pas la rétention du Cu dans le sol.

Selon la teneur en matière organique (exprimée par le % de solides volatils), les quatre sols artificiels s'inscrivent dans la gamme des sols naturels que l'on pourrait retrouver à la base des poteaux et sur les sites d'imprégnation de bois par le CCA. Quant aux valeurs de COD, on remarque que plus le contenu en M.O. augmente, plus la concentration moyenne de COD augmente, soit 0,02 g/kg (sol A), 0,09 g/kg (sol B), 0,16 g/kg (sol C), 0,30 g/kg (sol D). Ainsi, à des pH de sols semblables, une corrélation positive a été trouvée entre la teneur en matière organique (% TVS) et le COD des sols ( $r^2=0,99$ ,  $n=4$ ). Cette corrélation semble être logique, étant donné que le pH des sols qui aurait pu affecter la solubilisation de la matière organique est semblable. Selon les valeurs de COD exprimées en mg/l, les sols C et D seraient similaires aux sols retrouvés dans les horizons organiques des sols, tandis que les sols A et B seraient similaires aux sols minéraux (Harter et Naidu, 2001).

## CHAPITRE IV

### INFLUENCE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE SUR LA SPÉCIATION DE L'AS DANS LE SOL

#### 4.1 Introduction

Après la caractérisation des sols contaminés par du CCA, des essais en macrocosmes (voir le plan expérimental de la figure 3.1) ont été menés pendant 40 jours, en conditions aérobies et non saturées, en vue d'évaluer l'influence de la teneur en matière organique du sol sur la réduction de l'As(V) en As(III) et sur la méthylation de l'As (selon le protocole P54-J présenté à l'Annexe C). Les essais en macrocosmes ont été menés sur des sols inoculés avec une microflore extraite d'un sol naturel (3 réplicats pour chaque sol) et sur des sols non inoculés (2 réplicats pour chaque sol). La microflore utilisée pour l'inoculation des sols provenait d'un sol naturel contaminé par l'As, le Cr et le Cu, échantillonné à la base d'un poteau traité par du CCA-C/PEG. Dans le cas du sol D non inoculé, un seul réplicat a été pris en considération, étant donné que l'autre réplicat a été perdu lors des manipulations au laboratoire.

Dans le cadre des essais en macrocosmes l'influence de la matière organique a été suivie en analysant l'évolution dans le temps (à des intervalles établis) de deux types de paramètres :

- les formes chimiques de l'As dans le sol (As(III), As(V)) et dans la fraction soluble (extraits aqueux) (As(V), As(III), MMAA, DMAA);
- des paramètres liés à la dégradation de la matière organique du sol, soient le COD et le nombre d'hétérotrophes totaux et tolérants à l'As (V).

Une description des essais en macrocosmes et des analyses effectuées (voir Annexe C) est présentée dans les sections suivantes.

## 4.2 Matériel et Méthodes

### 4.2.1 Extraction de la microflore d'un sol naturel contaminé par l'As

Il a été décidé que la microflore utilisée pour l'inoculation des sols sera extraite d'un sol naturel contaminé par l'As. À cette fin, un sol naturel contaminé à la base d'un poteau traité par du CCA/PEG, mis en service depuis 11 ans, a été échantillonné (voir protocole P54-E) et caractérisé. L'échantillonnage s'est fait à une distance radiale de 4 cm du poteau et à une profondeur de 4 cm. Les résultats de la caractérisation physico-chimique et microbiologique du sol prélevé sont présentés au Tableau 4.1. Étant donné que la valeur de la concentration moyenne de l'As du sol était assez élevée, soit 146 mg As /kg sol sec, et que la population majoritaire d'hétérotrophes était tolérante à l'As(V), soit  $10^5$  ufc/g sol sec (unités formatrices de colonies/g sol sec), le sol naturel échantillonné a été jugé comme approprié pour l'extraction de la biomasse. Le sol échantillonné a été conservé à 4°C pendant 3 mois jusqu'à l'étape d'extraction et d'inoculation de la microflore dans le sol dans le cadre des essais en macrocosmes.

**Tableau 4.1 Caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'échantillon de sol naturel prélevé en surface à proximité d'un poteau traité au CCA**

pH <sup>a</sup>	Contenu en eau (%)	Solides volatils <sup>a</sup> (%)	COD <sup>a</sup> (g/kg)	As <sup>b</sup> (mg/kg)	Cu <sup>b</sup> (mg/kg)	Cr <sup>b</sup> (mg/kg)	H.T (ufc/g) <sup>c</sup>	H.T. tolerants à l'As(V) ufc/g) <sup>d</sup>
7,1 ± 0,1	31	5,8 ± 32	0,14 ± 32	146 ± 4	295 ± 16	118 ± 37	2,67 x 10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> : moyenne ± RPD (%) (n=2)

<sup>b</sup> : moyenne ± écart type (n=3)

<sup>c</sup> : nombre des hétérotrophes totaux

<sup>d</sup> : nombre des hétérotrophes tolérants à l'As(V)

Une procédure d'extraction de la microflore du sol naturel échantillonné a été choisie, en se basant sur deux méthodes d'extraction (Kingsley et Bohlool, 1981 et Jones *et al.*, 2000) conformément au protocole P54-F présenté à l'Annexe C. La méthode d'extraction retenue présentée dans le protocole P54-F a été choisie en fonction de la population d'hétérotrophes totaux extraits (ufc /ml solution d'extraction). Les résultats obtenus sont présentés en détails dans le protocole P54-F. Dans le cadre des essais en macrocosmes, l'extraction de la microflore a été faite le jour même de l'inoculation des sols. Le volume d'inoculum nécessaire pour l'inoculation des sols a été extrait à partir de 5 extractions de 10 g de sol prélevé. Pour chaque extraction, la microflore extraite retrouvée sous la forme de culot a été redissoute dans un volume de 35 ml de solution saline stérile NaCl (0,85 % (p/v)).

#### **4.2.2 Essais en macrocosmes**

Les sols synthétiques contaminés ont été stérilisés par radiations gamma (50 kGy) (Wolf *et al.*, 1989). Après stérilisation des sols, le pH et la capacité de rétention d'eau au champ (CRC) de chaque sol ont été déterminés, selon les protocoles P54-F et PSOA 23 présentés en Annexe C. L'efficacité de la stérilisation des sols a été vérifiée par un dénombrement d'hétérotrophes totaux en utilisant la méthode de décompte sur boîtes de Pétri.

#### **Préparation des macrocosmes**

Les 20 macrocosmes utilisés dans le cadre des essais consistaient en des réacteurs en verre de 1,1 litre, préalablement lavés à l'acide nitrique 10 % (v/v), rincés avec de l'eau déionisée et ensuite stérilisés par autoclavage (25 min, 120 ° C, 103,4 kPa). Deux cent soixante grammes de sol sec stérilisé (5 replicats pour chaque sol A, B, C et D) ont été transférés dans des conditions stériles, dans chacun des macrocosmes stérilisés. Les 20 sols étudiés ont été ensuite humidifiés avec de l'eau distillée stérile. Comme le contenu en eau des sols devait être ajusté à 80 % de la CRC la quantité d'eau ajoutée pour l'humidification des sols a été calculée en tenant compte du volume d'inoculum (13 ml).



macrocosmes ont été fermés et incubés pendant 24 h à la température de la pièce et à la noirceur.

### **Inoculation des sols**

Après 24 h, 3 des 5 réplicats de chaque sol ont été inoculés avec 13 ml d'inoculum, soit une solution saline 0,85 % (p/v) contenant la microflore extraite. L'extraction de la microflore était faite le jour même et contenait environ  $3,6 \times 10^5$  ufc/ml d'hétérotrophes totaux et environ  $9,4 \times 10^5$  ufc /ml d'hétérotrophes tolérants à l'As(V). Treize ml de solution saline stérile ont été ajoutés, en conditions stériles dans les 2 autres réplicats de sol non-inoculé.

### **Incubation aérobie**

Les macrocosmes ont été fermés et incubés pendant 40 jours à la noirceur et à la température de la pièce. Pour assurer des conditions aérobies dans les macrocosmes, ces derniers ont été aérés sous la hotte microbiologique et dans des conditions stériles aux jours 1, 5, 10, 15, 22, 35. Les temps d'aération des macrocosmes ont été moins fréquents que prévu par le protocole initial étant donné qu'on s'est aperçu que les conditions stériles des sols non inoculés étaient difficiles à maintenir. Des échantillons de sols ont été prélevés après 1 jour, 5 jours, 15 jours et 40 jours d'incubation en vue des analyses physico-chimiques et microbiologiques selon la feuille de travail du protocole P54-J. À chaque échantillonnage, environ 60 g de sol ont été prélevés dans chacun des macrocosmes. Les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'aux analyses. Les analyses suivantes ont été effectuées: le pH, le COD, les hétérotrophes totaux et tolérants à l'As, la concentration totale d'As dans le sol, la spéciation de l'As dans le sol (As(III) et As(V)), la concentration totale d'As dans l'extrait aqueux, la spéciation de l'As dans l'extrait aqueux (As(III), As(V), MMAA et DMAA) et les concentrations totales de Cu et de Cr dans le sol et dans l'extrait aqueux. De plus, au jour 1, le carbone organique total (COT), le carbone total (CT), et le contenu en azote total Kjeldahl

(NTK) ont été déterminés. Les détails des analyses effectuées se trouvent dans les prochains paragraphes.

#### **4.2.3 Caractérisation physico-chimique**

Le dosage de l'As dans les sols (As total, As(III), As(V)), le Cu et le Cr, le COD et le NTK ont été effectués par un laboratoire externe (Services analytiques Philip) et le dosage de l'As total et des formes chimiques de l'As dans les extraits aqueux (As(III), As(V), MMAA, DMAA) a été réalisé par le laboratoire du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ). La digestion de sols pour l'analyse des concentrations totales d'As, de Cu et de Cr, l'extraction de l'As, du Cu, du Cr du sol dans l'eau déionisée, la spéciation de l'As dans le sol, l'extraction du COD des sols, le pH et le contenu en eau ont été effectués au laboratoire.

#### **pH**

Étant donné l'importance du pH pour l'activité microbienne des sols et pour la rétention de l'As soluble dans le sol, il a été mesuré à chaque temps d'échantillonnage dans une suspension de 1:4 (sol : eau deionisée) selon le protocole P35 F (méthode ASTM D 4972-95a) présenté à l'Annexe A.

#### **Contenu en eau**

Le suivi du contenu en eau des sols pendant la période d'incubation a permis de rapporter tous les paramètres analysés sur une base de poids sec et d'évaluer la perte d'humidité des sols pendant les 40 jours d'incubation. Le contenu en eau a été déterminé selon la méthode décrite dans la section 3.2.2.

#### **Carbone organique total et azote total Kjeldahl**

La concentration en carbone organique total (COT) et l'azote total Kjeldahl (NTK) permettent de déterminer le rapport carbone /azote (C/N). De plus, la valeur du COT permet de situer les sols synthétiques par rapport aux sols naturels minéraux et

agricoles. L'analyse du COT et du NTK a été réalisée par un laboratoire externe selon les méthodes décrites dans la section 3.2. De plus, le carbone total des sols (CT) a été déterminé aux jours 1 et 40 par un four à induction LECO au laboratoire de génie minéral de l'École Polytechnique de Montréal.

### **Carbone organique dissous**

Le suivi du carbone organique dissous COD a été effectué en raison, d'une part, de sa relation avec l'activité microbienne, et d'autre part de sa relation avec l'As soluble. L'extraction du COD des sols et son dosage ont été réalisés conformément aux méthodes décrites à la section 3.2.2.

### **Concentration totale de Cu et de Cr des sols**

La détermination des concentrations de Cu et de Cr totaux par digestion des sols a été effectuée selon la méthode décrite à la section 3.2.4.

### **Concentration totale d'As et spéciation de l'As dans les sols**

La concentration de l'As total des sols a été déterminée par digestion des sols selon la méthode décrite à la section 3.2.4 (Balasoiu *et al.*, 2001). Le dosage d'As total a été déterminé par ICP-AES par un laboratoire externe (Services analytiques Philip). La limite de quantification rapportée pour l'As était de 1 µg/l.

Selon Panssar-Kallio *et al.* (1997) et Chappel *et al.* (1995) la méthode d'extraction de l'As total par HCl ne modifie pas le degré d'oxydation de l'As contenu dans le sol. Ainsi, la spéciation de l'As dans les sols sous forme d'As(III) et d'As(V) a été déterminée le jour même de l'extraction de l'As total du sol, sur un aliquot du digestat du sol par une méthode d'extraction liquide-liquide mise au point au laboratoire de la Chaire industrielle en assainissement et gestion des sites (Balasoiu *et al.*, 2001). Il faut noter que par cette méthode, les formes méthylées de l'As ne sont pas déterminées. Le principe d'extraction liquide-liquide repose sur une séparation sélective de l'As(III) et

l'As(V) basée sur l'affinité de l'As(III) pour le complexe organique d'ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDTC)-méthyl-isobutyl cétone (MIBK). En effet, dans la gamme de pH=4-5,6, le complexe APDTC - MIBK a une affinité élevée pour l'As(III) (Kamada, 1976). Après deux extractions successives avec le complexe APDTC-MIBK, deux phases ont été formées : une phase aqueuse contenant de l'As(V) et une phase organique contenant de l'As(III). Un aliquot de la phase aqueuse contenant l'As(V) a été analysé pour l'As total par ICP-AES. La limite de quantification rapportée de l'As était de 1 µg/l. L'As (III) peut être calculé par la différence entre l'As total et l'As(V).

Ensuite, la fiabilité de la technique a été déterminée à partir d'un bilan de masse par un « lavage en retour » ou « back-wash » de la phase organique. À cette fin, l'As(III) de la fraction organique contenant le complexe As(III)-APDC-MIBK a été extraite par deux extractions successives avec 10 ml HNO<sub>3</sub> 25 % (v/v). Un aliquot de la phase aqueuse séparée qui contenait de l'As(III) a été analysé pour l'As total par ICP-AES. Ainsi, la concentration d'As(III) mesurée à partir du sol extrait par « le lavage en retour » peut être comparée à la concentration de l'As(III) calculée par différence. Parallèlement à la spéciation de l'As dans le sol, la méthode d'extraction par solvant a été appliquée sur trois standards d'extraction, soit 100 µg/l d'As(III), 100 µg/l d'As(V) et 100 µg/l d'As(III)+As(V). Un bilan de masse par le « le lavage en retour » a été effectué sur ces standards afin de valider la méthode. De plus, un blanc procédural a été effectué en procédant de la même façon, mais en ajoutant de l'eau déionisée au lieu de l'échantillon. Les échantillons liquides pour la détermination de l'As ont été gardés à 4°C jusqu'aux analyses.

### **Concentration totale d'As et spéciation de l'As des extraits aqueux**

Le suivi de la spéciation de l'As dans la fraction soluble a été réalisé sur les extraits des sols avec de l'eau déionisée (18,8 mΩ) ayant un pH égal à 5,8. En général, l'utilisation d'eau déionisée comme agent d'extraction de l'As soluble est préféré aux autres agents

d'extraction de la phase soluble qui sont susceptibles de provoquer la conversion des formes chimiques de l'As initialement retrouvées dans le sol (Pongratz, 1998).

La procédure d'extraction de l'As soluble (voir le protocole P54-J en Annexe C) est adaptée de Pongratz (1998) et consistait à mettre en contact, dans un tube à centrifugeuse de 40 ml, une quantité de sol avec de l'eau déionisée dans un rapport sol : eau déionisée = 1 : 8. Parallèlement, un blanc procédural était effectué seulement avec de l'eau déionisée. Le dosage de l'As total, As(III), As(V), MMAA et DMAA de l'échantillon filtré et du blanc procédural était fait par HPLC-ICP-MS (chromatographie liquide à haute pression couplée à un spectromètre de masse à source ionisante au plasma d'argon) par un laboratoire externe (CEAEQ). L'analyse de la spéciation de l'As soluble était réalisée dans un délai d'environ une semaine après l'échantillonnage. Les échantillons liquides ont été gardés à 4<sup>0</sup> C et à l'abri de la lumière (pour empêcher la photo oxydation de l'As(III)) jusqu'aux analyses. La méthode de conservation des formes chimiques de l'As à 4<sup>0</sup>C semble être la meilleure méthode de conservation pour une période allant jusqu'à un mois (Bissen et Frimmel, 2000 ; Gong *et al.*, 2002).

Généralement, la méthode ICP-MS est une méthode sensible et précise pour déterminer les concentrations des éléments traces. Le couplage du HPLC avec l'ICP-MS est une combinaison d'un système chromatographique puissant avec une unité sensible de détection (Pongratz, 1998). Tout d'abord, la séparation des espèces chimiques de l'As est effectuée par une colonne chromatographique (les conditions chromatographiques sont présentées dans le tableau 4.2). Ensuite, l'échantillon est entraîné dans un plasma d'argon par l'entremise d'une pompe et d'un nébuliseur. Les métaux contenus dans l'échantillon sont atomisés et ionisés dans le plasma. Les ions produits sont ensuite introduits dans la chambre du spectromètre de masse ou ils sont dirigés par une série de plaques métalliques chargées pour être finalement captés par un détecteur. La concentration d'un élément de masse spécifique est déterminée en comparant les quantités d'ions captés dans l'échantillon et dans les solutions étalons. Des courbes de

calibration ont été réalisées pour chaque standard, soit l'As(III), l'As(V), le MMAA et le DMAA. Les limites de quantification rapportées étaient de 0,0003 mg/l pour l'As(III), 0,0008 mg/l pour l'As(V), 0,0007-0,001 mg/l pour le MMAA, et 0,001 mg/l pour le DMAA.

**Tableau 4.2 Conditions d'opération du HPLC**

Colonne chromatographique	modèle Ionpack AS-14 (DIONEX), 4 mm x 250 mm,
Éluant A	bicarbonate d'ammonium 0,158 g/l
Éluant B	solution de bicarbonate d'ammonium 0,158 g/l et d'acide tartrique 6,752 g/l.
Débit d'injection	1,0 ml/min
Volume injecté	50 µl

#### **Concentration totale de Cu et de Cr des extraits aqueux**

Les concentrations de Cr et de Cu solubles ont été déterminées afin de comparer leur potentiel de mobilisation dans les sols par rapport à celui de l'As. Les concentrations solubles de Cu et de Cr ont été déterminées par un laboratoire externe sur un aliquot de l'extrait aqueux lors de la détermination de l'As soluble selon la méthode ICP-AES. Les limites de détection rapportées étaient 2µ g/l pour le Cr et 1 µ g/l pour le Cu.

#### **4.2.4 Caractérisation microbiologique**

En vue de s'assurer de la viabilité des microorganismes dans les sols après l'inoculation et également d'évaluer l'influence de la croissance des microorganismes (totaux et tolérants à l'As(V)) sur la spéciation de l'As dans le sol, une caractérisation microbiologique des sols inoculés a été réalisée. Cette caractérisation a été faite, au laboratoire, par le biais de dénombrements des hétérotrophes totaux et tolérants à l'As(V) en utilisant la technique de décompte sur boîtes de Pétri. Pour vérifier les conditions abiotiques, des dénombrements des hétérotrophes totaux ont été effectués sur les répliqués de sols non inoculés à chaque temps d'échantillonnage.

### **Dénombrement des hétérotrophes totaux**

Le décompte des hétérotrophes totaux était basé sur une extraction de 10 g de sol par une solution saline NaCl (0.85 %, p/v) stérilisée (autoclavée pendant 25 min, 120 ° C, 103,4 kPa). Cette première solution saline a été diluée en série 5 fois pour pouvoir compter des colonies distinctes. Les microorganismes retrouvés dans chaque dilution ont été inoculés (en triplicata) sur le milieu nutritif non sélectif stérilisé et gélifié dans les boîtes de Pétri (15 g/l agar purifié et 27,5 g/l Tryptic Soy Broth sans dextrose). Les géloses ont été incubées à la température de la pièce ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et à la noirceur pendant 10 jours. Seules les géloses contenant entre 30 et 300 colonies ont été comptées. Étant donné que chaque colonie qui se développe résulte d'une unité viable, soit un seul organisme ou un groupe d'organismes, les résultats sont exprimés en unités formatrices de colonies/g sol sec (ufc/g sol sec).

### **Dénombrement des microorganismes tolérants à l'As(V)**

Les microorganismes tolérants à l'As(V) ont été dénombrés selon une méthode adaptée de Turpeinen *et al.* (1999) (protocole P 54-I). Un échantillon de sol (10 g) a été extrait dans une solution saline NaCl (0,85 % p/v) stérilisée et ensuite dilué par dilution en série. Un volume connu de chaque dilution a été étalé sur des géloses (en triplicata) contenant un milieu sélectif stérilisé (15 g/l agar purifié, 27 g/l Tryptic Soy Broth sans dextrose et 50 mg/l  $\text{As}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ). Les géloses étalées ont été incubées à la noirceur et à la température de la pièce pendant 10 jours. Le pH du milieu sélectif était de 6,5. Ainsi, l'ajustement du pH du milieu n'a pas été nécessaire étant donné que cette valeur de pH respectait le pH initial des sols, soit un pH proche de la neutralité. La concentration d'As(V) du milieu nutritif gélifié a été vérifiée par un laboratoire externe. Ainsi, le milieu nutritif gélifié contenait 50 mg d'As(V) par kg de milieu nutritif.

### 4.3 Résultats et discussion

#### 4.3.1 Caractérisation physico-chimique initiale des sols

Les résultats de la caractérisation physico-chimique initiale des sols inoculés (I) et non inoculés (NI) au jour 1 d'incubation sont présentés au Tableau 4.3. Pour les sols inoculés les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$ ) et pour les sols non inoculés sous forme de moyenne  $\pm$  RPD (%) ( $n=2$ ). Pour le sol D non inoculé, les résultats représentent la valeur d'un seul réplicat. Pour la comparaison des moyennes, le test de Student a été utilisé à un niveau de confiance de 95 %.

Selon le Tableau 4.3 on note que les concentrations moyennes totales d'As des quatre sols (inoculés et non inoculés) sont similaires (il n'y a pas de différences significatives entre les concentrations moyennes,  $p>0,1$ ). Dans les sols inoculés, les concentrations d'As varient de  $679 \pm 41$  mg/kg (sol A) à  $723 \pm 54$  mg/kg (sol D).

Le contenu moyen en eau des sols (inoculés et non inoculés) à 80 % CRC) est de  $8,8 \pm 0,4$  % dans le sol A,  $15 \pm 0,2$  % dans le sol B,  $17 \pm 0,3$  % dans le sol C et  $24 \pm 0,2$  % dans le sol D. Les valeurs de pH moyen des sols inoculés et non inoculés sont similaires et proches de la neutralité. Cette valeur de pH est théoriquement favorable à l'activité microbienne des sols. Il est à noter qu'après la stérilisation par radiations gamma, le pH des sols n'a pas changé.

On note que la concentration de carbone organique dissous (COD) des sols inoculés et non inoculés augmentait avec la teneur en matière organique. Ainsi, dans les sols inoculés, la concentration de COD dans le sol le plus organique D était environ 20 fois plus élevée ( $0,82 \pm 0,03$  g/kg) par rapport à la concentration retrouvée dans le sol minéral A ( $0,04 \pm 0,00$  g/kg).



**Tableau 4.3 Caractéristiques physico-chimiques des sols au jour 1 d'incubation**

Sol	As <sup>d</sup> (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Cr (mg/kg)	As soluble (mg/kg)	CT (g/kg)	pH	COT (g/kg)	NTK (g/kg)	C/N	COD (g/kg)
A(I) <sup>a</sup>	679 ± 41	278 ± 10	199 ± 8	38 ± 6 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,4	7,1 ± 0,0	2,0 ± 0,2	0,1 ± 0,0	16	0,04 ± 0,00
A(NI) <sup>b</sup>	756 ± 44	311 ± 32	151 ± 28	34 ± 19	2,0 ± 0	7,2 ± 0,8	1,4 ± 57	0,1 ± 53	14	0,05 ± 35
B(I) <sup>a</sup>	662 ± 66	535 ± 13	628 ± 193	46 ± 3	17,1 ± 2,2	6,7 ± 0,0	13,3 ± 1,5	1,1 ± 0,2	13	0,14 ± 0,00
B(NI) <sup>b</sup>	655 ± 23	531 ± 6	531 ± 30	44 ± 4	20,0 ± 1	6,6 ± 0,4	11,5 ± 9	0,9 ± 2	12	0,14 ± 0
C(I) <sup>a</sup>	703 ± 59	620 ± 23	748 ± 6	55 ± 2	26,5 ± 2,1	6,9 ± 0,0	34,3 ± 5,5	1,9 ± 0,1	18	0,46 ± 0,09
C(NI) <sup>b</sup>	716 ± 49	591 ± 7	723 ± 16	52 ± 6	26,3 ± 5	6,8 ± 2,2	50 ± 24	1,8 ± 59	28	0,43 ± 46
D(I) <sup>a</sup>	723 ± 54	580 ± 8	974 ± 97	100 ± 2	52,3 ± 6,1	6,9 ± 0,0	54,0 ± 5,5	3,0 ± 0,5	18	0,82 ± 0,03
D(NI) <sup>c</sup>	738	616	683	108	50,4	6,7	61,0	3,0	20	0,75

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)

<sup>b</sup> : moyenne ± RPD % (n=2)

<sup>c</sup> : un réplicat

<sup>d</sup> : As<sub>total</sub> calculé= As(III) back-wash + As(V)

La concentration moyenne de COD des sols a augmenté entre 1,5 et 3 fois après la stérilisation des sols par radiations gamma, probablement à cause de la lyse cellulaire et de la dégradation de la matière organique.

Il faut noter qu'au jour 1 d'incubation, il n'y avait pas de différences significatives entre la concentration de COD des sols inoculés et non inoculés. Les résultats de l'extraction des sols à l'eau déionisée, montrent que plus le sol est organique, plus la proportion d'As soluble augmente. En effet, la concentration d'As total soluble a été environ 2,5 fois plus élevée dans le sol le plus organique D ( $100 \pm 2$  mg/kg sol) que dans le sol A ( $38 \pm 6$  mg/kg sol). Dans les sols intermédiaires B et C les concentrations d'As total soluble sont très proches, soit  $46 \pm 3$  mg/kg dans le sol B et  $55 \pm 2$  mg/kg dans le sol C. Au jour 1 d'incubation, une corrélation positive a été trouvée entre la concentration de COD (g/kg sol sec) du sol et la concentration d'As total soluble (mg/kg sol sec) ( $r^2=0,88$ ,  $n=8$ ), tandis qu'une corrélation entre la concentration d'As total des sols et la concentration d'As total soluble n'a pas été trouvée ( $r^2=0,16$ ,  $n=8$ ). Un manque de corrélation entre la concentration d'As total du sol et l'As total soluble a été également rapporté par Turpeinen *et al.* (2002, 2003) et Jones (1998).

Il est à noter que l'extraction de l'As à l'eau déionisée ne représente pas le lessivage réel de l'As, mais c'est une méthode par laquelle on accélère le temps de contact de l'eau avec le sol. Toutefois, elle donne une idée du potentiel de solubilisation et de mobilisation de l'As dans le sol. À la lumière de ces résultats, on peut conclure que la concentration totale d'As n'est pas un paramètre fiable pour la prédiction de la concentration d'As soluble et que le COD du sol est un paramètre qui pourrait contrôler la concentration d'As soluble.

La valeur de COT des sols inoculés varie de  $2,0 \pm 0,2$  g/kg dans le sol A à  $54,0 \pm 5,5$  g/kg dans le sol plus organique D, tandis que la valeur de NTK varie de  $0,1 \pm 0,0$  g/kg dans le sol A à  $3,0 \pm 0,5$  g/kg dans le sol D. Toutefois, les valeurs de C/N des sols

(inoculés) sont presque similaires, soit égales à 16 (sol A), à 13 (sol B) et à 18 (sols C et D) et sont comprises dans l'intervalle de C/N ordinairement considéré pour assurer une bonne activité microbienne, soit 10-30 (Godsy,1998). De plus, ces valeurs sont aussi comprises dans l'intervalle de C/N des sols naturels (9-24).

### 4.3.2 Caractérisation microbiologique des sols

L'évolution temporelle de la population des hétérotrophes totaux et tolérants à l'As(V) dans les sols après l'inoculation (ufc/g sol sec) est présentée aux Tableaux 4.4 et 4.5. Les valeurs de ufc/g sol représentent des moyennes de 3 réplicats  $\pm$  écart type. Les résultats sont schématisés sous formes de graphiques dans les figures 4.1 et 4.2.

#### Dénombrement des hétérotrophes totaux

Selon la figure 4.1 (et le Tableau 4.4), on note que la densité des micro-organismes hétérotrophes totaux, au jour 1 d'incubation, était plus élevée dans les sols organiques B, C et D (maximum de  $10^5$  dans le sol D) et plus faible ( $10^1$ ) dans le sol minéral A. La croissance des hétérotrophes totaux dans le sol A était plus importante ( $10^2$ ) entre le jour 5 et 15, tandis que dans les sols organiques B, C et D elle était plus importante ( $10^1$ ) entre le jour 1 et 5. À la fin de la période d'incubation, il n'y avait pas de différences significatives ( $p > 0,1$ ) entre le nombre d'hétérotrophes totaux des sols A, B, C et D.

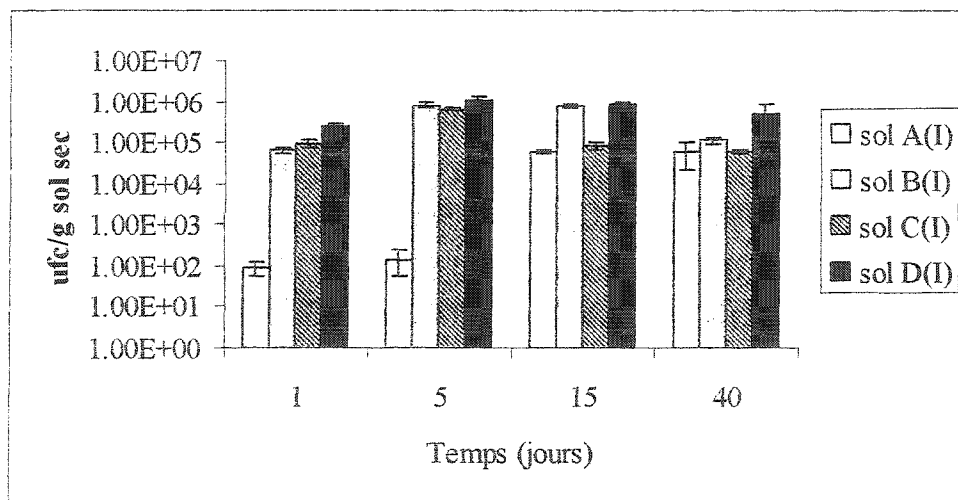
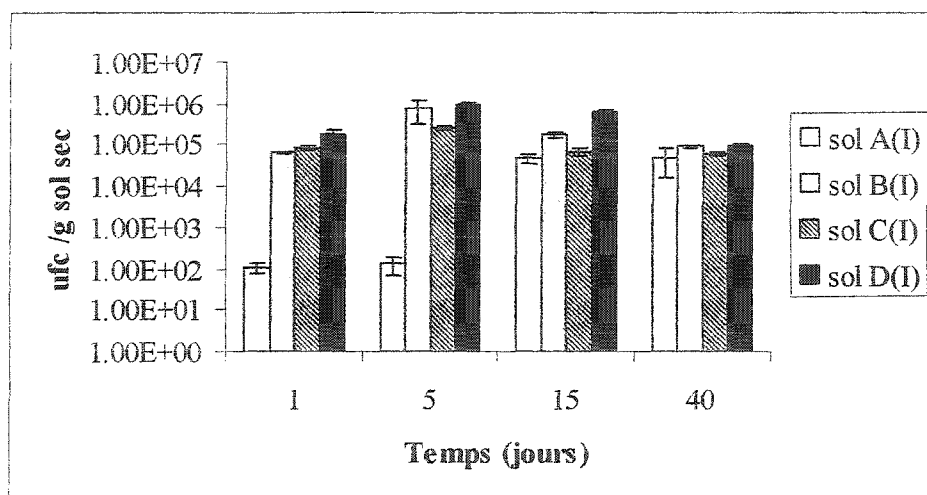


Figure 4.1 Hétérotrophes totaux en fonction du temps d'incubation

### Dénombrement des hétérotrophes tolérants à l'As(V)

La figure 4.2 (et le Tableau 4.5) indique qu'au jour 1 d'incubation, la densité des micro-organismes hétérotrophes tolérants à l'As(V) (ufc/g sol sec) était plus élevée dans les sols organiques B, C et D (maximum  $10^5$  dans le sol D) et plus faible dans le sol minéral A ( $10^2$ ). En fonction du temps, la croissance du nombre d'hétérotrophes tolérants à l'As(V) dans les sols était similaire à la croissance des hétérotrophes totaux. À la fin de la période d'incubation, le nombre d'hétérotrophes tolérants à l'As(V) était le même dans tous les sols, soit égal à  $10^4$ . Les écarts-type pour le nombre de colonies des hétérotrophes totaux et tolérants à l'As (ufc/g sol sec) montrent que les résultats sont reproductibles.



**Figure 4.2 Hétérotrophes tolérants à l'As(V) en fonction du temps d'incubation**

**Tableau 4.4 Hétérotrophes totaux dans les sols inoculés (ufc/g sol sec) en fonction du temps d'incubation**

Sol	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A(I)	$(9,2 \pm 3,6) \times 10^{-1}$	$(1,4 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	$(5,7 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$(6,1 \pm 4,0) \times 10^{-4}$
B(I)	$(6,4 \pm 1,0) \times 10^{-4}$	$(7,8 \pm 1,3) \times 10^{-5}$	$(7,5 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-5}$
C(I)	$(9,2 \pm 1,8) \times 10^{-4}$	$(6,4 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	$(8,1 \pm 1,6) \times 10^{-4}$	$(5,8 \pm 0,5) \times 10^{-4}$
D(I)	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(8,7 \pm 1,7) \times 10^{-5}$	$(5,1 \pm 3,4) \times 10^{-5}$

**Tableau 4.5 Hétérotrophes tolérants à l'As(V) dans les sols inoculés (ufc/g sol sec) en fonction du temps d'incubation**

Sol	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A(I)	$(1,0 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	$(1,3 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$(4,8 \pm 1,3) \times 10^{-4}$	$(4,8 \pm 3,3) \times 10^{-4}$
B(I)	$(6,7 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$(7,6 \pm 4,5) \times 10^{-5}$	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(9 \pm 0,7) \times 10^{-4}$
C(I)	$(8,3 \pm 1,2) \times 10^{-4}$	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(6,7 \pm 1,3) \times 10^{-4}$	$(6,1 \pm 1) \times 10^{-4}$
D(I)	$(1,9 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	$(1,0 \pm 0,0) \times 10^{-6}$	$(6,4 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$(9,8 \pm 0,7) \times 10^{-4}$

### Dénombrement des hétérotrophes totaux dans les sols non-inoculés

Les résultats des dénombrements des hétérotrophes totaux dans les sols non-inoculés pendant la période d'incubation (ufc/g sol sec) sont présentés dans le Tableau 4.6. Malgré les précautions prises, en travaillant dans des conditions stériles lors des échantillonnages et de l'aération des macrocosmes, des hétérotrophes totaux ont été dénombrés dans les sols organiques non inoculés (B,C et D) à partir du jour 5. On note que dans le sol minéral A (0,5 % M.O.), des hétérotrophes totaux ont été dénombrés au jour 40. La croissance plus significative des micro-organismes dans les sols plus organiques B, C et D pourrait être due à une stérilisation inefficace des ces sols à cause de la protection des micro-organismes indigènes conférée par la matière organique. À la fin de la période d'incubation la population des hétérotrophes totaux dans les sols non-inoculés était comprise entre  $10^4$  et  $10^6$ , et comparable aux sols inoculés. En conclusion, une distinction entre les sols inoculés et non inoculés pourra être faite seulement dans le cas du sol A, et non dans le cas des sols organiques, B, C et D.

**Tableau 4.6 Hétérotrophes totaux des sols non-inoculés (NI) (ufc/g sol sec) en fonction du temps d'incubation**

Sol	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A4(NI)	0	0	0	0
A5(NI)	0	0	0	$1,2 \times 10^4$
B4(NI)	0	$8,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$
B5(NI)	0	0	$2,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$
C4(NI)	0	0	$1,1 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$
C5(NI)	$9,0 \times 10^4$	$8,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
D4(NI)	0	$8,9 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$

### 4.3.3 Carbone organique dissous (COD)

L'évolution de la concentration de carbone organique dissous (COD) en fonction du temps d'incubation dans les sols (inoculés et non inoculés) est présentée au Tableau 4.7. Pendant 40 jours d'incubation la concentration moyenne de COD a diminué significativement ( $p < 0,05$ ) dans les sols moins organiques A (inoculé) et B (inoculé et

non inoculé). La diminution de COD dans le sol B (inoculé et non inoculé) était plus importante (57 %) que dans le sol A (inoculé) (25 %). La concentration de COD dans le sol A (non inoculé) n'a pas diminué significativement ( $p > 0,1$ ). Ainsi, une distinction entre le sol A (inoculé) et le sol A (non inoculé) peut être faite, ce qui est en accord avec le Tableau 4.6. De plus, on note que dans le sol A (inoculé), la concentration de COD diminue significativement ( $p < 0,01$ ) entre le jour 5 et 15, ce qui coïncide avec la croissance microbienne d'environ  $10^2$  pendant cet intervalle de temps. L'évolution de COD en fonction du temps est la même dans le sol B inoculé que dans le sol B non-inoculé, et la diminution de COD dans les deux sols est plus significative entre le jour 15 et 40 ( $p < 0,01$ ). Ainsi, une distinction claire entre l'activité microbienne du sol B inoculé par rapport au sol B non-inoculé ne peut être faite, ce qui est en accord avec les résultats du Tableau 4.6.

**Tableau 4.7 Concentrations de COD (g/kg sol) en fonction du temps d'incubation**

Sol	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A(I) <sup>a</sup>	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
A(NI) <sup>b</sup>	0,05 ± 35	0,05 ± 38	0,04 ± 7	0,04 ± 54
B(I) <sup>a</sup>	0,14 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,00
B(NI) <sup>b</sup>	0,14 ± 0	0,12 ± 10	0,10 ± 6	0,07 ± 1
C(I) <sup>a</sup>	0,46 ± 0,09	0,65 ± 0,27	1,12 ± 0,60	1,39 ± 0,12
C(NI) <sup>b</sup>	0,43 ± 46	0,35 ± 6	0,51 ± 24	1,33 ± 22
D(I) <sup>a</sup>	0,82 ± 0,03	1,7 ± 0,3	0,76 ± 0,01	1,57 ± 0,09
D(NI) <sup>c</sup>	0,75	1,27	0,73	1,39

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)

<sup>b</sup> : moyenne ± RPD (%) (n=2)

<sup>c</sup> : un réplicat



En revanche, dans les sols organiques C et D (inoculés et non inoculés) la concentration de COD augmente significativement pendant la période d'incubation ( $p < 0,001$ ). Dans les sols organiques C (inoculé et non inoculé) la concentration moyenne de COD augmente de 67 % et dans le sol D (inoculé et non inoculé) augmente de 48 % après 40 jours d'incubation.

Dans le sol C (non inoculé) le COD a augmenté d'une manière significative ( $p < 0,05$ ) entre le jour 15 et 40, dû, probablement à la présence des hétérotrophes totaux. Ainsi, une distinction claire entre l'activité microbienne du sol C inoculé par rapport au sol C non inoculé ne peut être faite, ce qui est en accord avec les populations d'hétérotrophes dénombrées (voir Tableau 4.6).

En conclusion, l'augmentation significative du COD dans les sols organiques C et D (inoculés et non inoculés) pendant la période d'incubation, pourrait être due à une dégradation de la matière organique (e.g. sucres, d'hemicellulose) plus intense dans ces sols (par rapport aux sols A et B) et qui se traduit par une accumulation de substances solubles de faibles poids moléculaires (e.g. acides organiques) (Martinez *et al.*, 2003). De plus, une distinction claire entre l'activité microbienne des sols organiques B, C et D inoculés et non inoculés n'a pas pu être faite à cause de la croissance microbienne observée à partir du jour 5 dans les sols non-inoculés.

#### 4.3.4 Spéciation de l'As dans les sols

Les résultats bruts de la spéciation de l'As dans les sols suite à l'extraction liquide-liquide à chaque temps d'échantillonnage sont présentés dans les Tableaux D2-D5 à l'Annexe D. Le bilan de masse pour la spéciation de l'As dans les sols suite aux extractions liquide-liquide ( $(As(V) + As(III) \text{ back-wash}) * 100 / As \text{ total mesuré}$ ) était compris entre 98 % et 135 %. Les résultats des concentrations totales de l'As des sols sont présentés au Tableau 4.8. Étant donné que le plus souvent le bilan de masse était  $>100$  %, les concentrations totale d'As représentent les valeurs calculées ( $As(III) \text{ back-wash} + As(V)$ ). De plus, la concentration totale d'As(III) dans les sols n'a pas pu être

calculée par la différence entre l'As total et l'As(V), et les concentrations d'As(III) représentent les valeurs mesurées suite à l'étape de « lavage en retour » ou « back-wash » de la phase organique. La spéciation de l'As dans les sols en fonction du temps d'incubation est présentée aux Tableaux 4.9 et 4.10.

**Tableau 4.8 Concentrations d'As total <sup>a</sup> des sols (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation**

Sol	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A(I) <sup>b</sup>	679 ± 41	692 ± 26	705 ± 81	716 ± 42
A(NI) <sup>c</sup>	756 ± 44	698 ± 30	608 ± 23	825 ± 113
B(I) <sup>b</sup>	662 ± 66	729 ± 62	710 ± 95	722 ± 16
B(NI) <sup>c</sup>	655 ± 23	571 ± 96	750 ± 61	669 ± 19
C(I) <sup>b</sup>	703 ± 59	672 ± 65	570 ± 43	830 ± 70
C(NI) <sup>c</sup>	716 ± 49	610 ± 82	552 ± 43	759 ± 27
D(I) <sup>b</sup>	723 ± 54	738 ± 19	573 ± 31	803 ± 79
D(NI) <sup>d</sup>	739	628	705	759

<sup>a</sup> : As total calculé = As(III) back-wash + As(V)

<sup>b</sup> : moyenne ± écart type (n=3)

<sup>c</sup> : moyenne ± écart type (n=2)

<sup>d</sup> : un réplicat

L'examen du tableau 4.8 indique que les concentrations d'As total dans les sols A et B (inoculés et non inoculés) étaient constantes pendant la période d'incubation. Selon le test de Student les différences entre les concentrations moyennes d'As total pendant le temps dans les sols A et B étaient non-significatives ( $p > 0,1$ ). Dans les sols C et D (inoculés) le test de Student indique des différences significatives ( $p < 0,01$ ) entre les concentrations d'As total pendant 40 jours. Par contre, dans le sol C (non inoculé) la concentration est restée constante pendant la période d'incubation ( $p > 0,1$ ). Ainsi, les différences significatives de l'As total dans les sols C et D (inoculés) seraient due à

l'hétérogénéité des sols. Un nombre plus élevé de réplicats pour chaque sol aurait pu améliorer l'interprétation statistique des résultats en fonction du temps.

Le Tableau 4.9 indique qu'au jour 1 d'incubation, l'As était présent sous la forme majoritaire d'As(V) dans tous les sols ( $> 92 \%$ ). Malgré le fait que les sols étaient contaminés par l'As(V) (l'état d'oxydation de l'As dans la solution de CCA est pentavalent), on remarque que l'As(III) était déjà présent dans les sols à partir du jour 1 d'incubation. Les proportions d'As(III) (voir le Tableau 4.10) des sols organiques B, C et D (M.O.  $\geq 5 \%$ ) sont presque similaires (5,4% - 6,8%) et sont plus élevées par rapport au sol minéral A (3,4 %). Cela dénote qu'une teneur en matière organique du sol  $\geq 5 \%$  a entraîné la réduction de l'As(V) en As(III) avant le début des essais en macrocosmes, probablement pendant la période de contamination.

Une augmentation de la proportion d'As(III) avec la teneur en matière organique dans des sols synthétiques contaminés artificiellement par le CCA-C a aussi été observée par Balasoiu *et al.* (2001). Ainsi, la proportion d'As (III) calculée suite au lavage en retour, était de plus en plus élevée, soit environ 5 % pour un sol contenant 0,5 % M.O., 19,6 % pour un sol contenant 7,75 % M.O. et 26,9 % pour un sol contenant 15 % M.O. Dans les travaux de Balasoiu *et al.* (2001), l'intervalle de variation de la teneur en matière organique des sols était le même (0,5 %-15 %) que celui utilisé dans la présente étude, mais la source de matière organique était différente (tourbe) et le pH des sols était plus acide (5,5).

Dans le temps, la proportion moyenne d'As(III) du sol a diminué dans les sols moins organiques A et B, tandis que dans les sols organiques C et D, elle semble avoir légèrement augmenté. Dans les sols moins organiques A (inoculé et non-inoculé) et B (inoculé) l'As(III) a diminué dans le même ordre de grandeur, soit environ 2 % après 40 jours (voir Tableau 4.10). Dans le sol A (inoculé), la concentration moyenne d'As(III) a diminué significativement ( $p < 0,05$ ) de  $24 \pm 6$  mg/kg (qui vaut  $3,4 \pm 0,8 \%$ ) à environ

$10 \pm 0$  mg/kg (qui vaut  $1,4 \pm 0,1\%$ ). Dans le sol B (inoculé), la concentration moyenne d'As(III) a diminué ( $p < 0,05$ ) de  $68 \pm 20$  mg/kg (qui vaut  $9,6 \pm 3,1 \%$ ) à  $32 \pm 1$  (qui vaut  $4,4 \pm 0,1\%$ ).

Tableau 4.9 Spéciation de l'As dans les sols (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation

Sol	As(V)				As(III) (back-wash)			
	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A(I) <sup>a</sup>	655 ± 41	680 ± 26	698 ± 81	706 ± 42	24 ± 6	12 ± 4	7 ± 3 <sup>c</sup>	10 ± 0
A(NI) <sup>b</sup>	726 ± 8 (44)	679 ± 6 (30)	608 ± 5 (23)	815 ± 20 (113)	30 <sup>d</sup>	19 ± 20 (3)	< LDR <sup>e</sup>	10 ± 4 (0)
B(I) <sup>a</sup>	594 ± 63	676 ± 62	673 ± 95	690 ± 16	68 ± 20	52 ± 1	37 ± 6	32 ± 1
B(NI) <sup>b</sup>	614 ± 5 (23)	535 ± 25 (96)	722 ± 12 (60)	635 ± 4 (18)	41 ± 5 (2)	36 ± 47 (12)	28 ± 42 (8)	34 ± 23 (6)
C(I) <sup>a</sup>	665 ± 59	620 ± 57	538 ± 42	756 ± 69	38 ± 7	52 ± 32	32 ± 8	74 ± 9
C(NI) <sup>b</sup>	668 ± 10 (49)	572 ± 20 (82)	514 ± 11 (39)	694 ± 6 (27)	48 ± 13 (4)	38 ± 37 (10)	38 ± 25 (6)	65 ± 6 (3)
D(I) <sup>a</sup>	673 ± 54	682 ± 8	508 ± 31	721 ± 79	50 ± 1	56 ± 17	65 ± 3	82 ± 6
D(NI) <sup>d</sup>	678	582	608	686	61	46	97	73

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)<sup>b</sup> : moyenne ± RPD (%) (n=2) ( Les écarts type sont entre les parenthèses).<sup>c</sup> : 2 réplicats sur 3 étaient < LDR (1 µg/l)<sup>d</sup> : un réplicat<sup>e</sup> : LDR = 1 µg/l

**Tableau 4.10 Proportion d'As(III)<sup>a</sup> (%) en fonction du temps d'incubation**

Sol	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A(I) <sup>b</sup>	3,4 ± 0,8	1,7 ± 0,5	1 ± 0,4 <sup>d</sup>	1,4 ± 0,1
A(NI) <sup>c</sup>	3,8 <sup>e</sup>	2,7 ± 0,3	< LDR	1,2 ± 0,1
B(I) <sup>b</sup>	9,6 ± 3,1	7,2 ± 0,6	5,2 ± 1,1	4,4 ± 0,1
B(NI) <sup>c</sup>	6,3 ± 0,3	6,4 ± 2,4	3,7 ± 1,1	5 ± 0,8
C(I) <sup>b</sup>	5,4 ± 0,6	7,8 ± 4	5,6 ± 1,5	8,9 ± 1,4
C(NI) <sup>c</sup>	6,7 ± 0,3	6,2 ± 0,9	6,9 ± 1,4	8,5 ± 0,4
D(I) <sup>b</sup>	6,8 ± 0,1	7,6 ± 2,3	11 ± 0,8	10 ± 1,3
D(NI) <sup>c</sup>	8,2	7,4	13,7	9,6

<sup>a</sup>: % As(III) = As(III) backwash/ As total calculé (As(III) backwash + As(V))\*100

<sup>b</sup>: moyenne ± écart type (n=3)

<sup>c</sup>: moyenne ± écart type (n=2)

<sup>d</sup>: 2 valeurs sur 3 étaient < LDR (1 µg/l)

<sup>e</sup>: un réplicat

La diminution de l'As(III) dans les sols A (inoculé et non inoculé) et B (inoculé) serait probablement reliée à une oxydation de l'As(III) en As(V). Comme on pouvait s'y attendre, la diminution d'As (III) dans les sols A (inoculé et non-inoculé) et B (inoculé) a été accompagnée d'une augmentation d'As(V) pendant 40 jours d'incubation. Toutefois, cette augmentation n'était pas significative à cause du domaine de concentrations très faibles d'As(III) par rapport à l'As(V). Il faut noter que dans le sol B (non inoculé) les concentrations totale d'As(III) et d'As(V) n'ont pas changé pendant 40 jours d'incubation (  $p > 0,1$  ).

En revanche, une teneur en matière organique des sols  $\geq 7,5$  % a entraîné pendant 40 jours d'incubation une réduction de l'As(V) en As(III). En conséquence, les concentrations d'As(III) dans les sols C et D ont augmenté pendant 40 jours de façon significative ( $p < 0,01$ ). Ainsi, l'As(III) a augmenté dans la même mesure dans les deux sols (inoculés), soit environ 3 %. Dans le sol C, la proportion moyenne d'As(III)

a augmenté significativement de  $5,4 \pm 0,6 \%$  (qui vaut  $38 \pm 7 \text{ mg/kg}$ ) à  $8,9 \pm 1,4 \%$  (qui vaut  $74 \pm 9 \text{ mg/kg}$ ). Dans le sol D la proportion moyenne d'As(III) a augmenté ( $p < 0,05$ ) de  $6,8 \pm 0,1 \%$  (qui vaut  $50 \pm 1 \text{ mg/kg}$ ) à  $10,2 \pm 1,3$  (qui vaut  $82 \pm 6 \text{ mg/kg}$ ).

Par rapport aux sols moins organiques A et B, dans les sols plus organiques C et D, l'augmentation d'As(III) n'était pas traduite par une diminution de l'As(V) dans les sols, et cela est probablement dû à la précision des mesures.

En conclusion, pendant la période d'incubation de 40 jours, la réduction d'As(V) en As(III) des sols organiques C et D ( $\text{M.O} \geq 7,5 \%$ ) était faible, et la forme majoritaire de l'As retrouvée dans les sols est restée l'As(V). Dans le cas de l'As, aucune étude n'a été encore menée sur les facteurs influençant la réduction d'As(V) en As(III) par la matière organique. Dans notre cas, la faible réduction de l'As(V) en As(III) pendant 40 jours dans les sols organiques C et D pourrait être reliée à la structure chimique de la matière organique. Plus précisément, elle pourrait être liée à son contenu en groupes fonctionnels réactifs trouvés surtout dans la composition des acides humiques et fulviques, qui sont un important réservoir de donneurs d'électrons (Wittbrodt et Palmer, 1996 ; Redman *et al.*, 2002). Le facteur temps pourrait aussi être important, étant donné qu'il se peut qu'une grande partie réactive de la matière organique soit déjà oxydée avant les essais en macrocosmes, probablement pendant la contamination des sols. Ainsi, plus la matière organique est oxydée, plus sa capacité de donner des électrons diminue. Par exemple, dans le cas de la réduction du Cr(VI) en Cr(III) par la matière organique ajoutée au sol, le Cr(VI) soluble était réduit dans les premiers 10 jours d'incubation (Bolan *et al.*, 2003). De plus, la réduction d'As(V) en As(III) par la matière organique est spécifique à chaque sol, étant dépendante aussi des paramètres physico-chimiques et microbiologiques du sol. Ainsi, un facteur susceptible d'affecter la réduction de l'As(V) en As(III) par la matière organique est la présence dans le sol du Cr(VI), qui pourrait accepter, lui aussi, des électrons suite à l'oxydation de la matière

organique (Bolan *et al.*, 2003). Le pH du sol pourrait également influencer le taux de réduction de l'As(V) en As(III). Sachant que, suite à la réduction d'As(V) en As(III), des ions OH<sup>-</sup> se libèrent (les protons se consomment) (voir l'équation 2.12), un pH acide serait probablement plus favorable à la réduction, comme d'ailleurs c'est le cas pour la réduction du Cr(VI). De plus, la force ionique des sols, qui aurait pu être modifiée par l'ajout de l'inoculum, suspendu dans une solution de NaCl d'environ 0,1 M, est un facteur susceptible d'influencer la réduction de l'As(V) en As(III) par la matière organique. Toutefois, dans le cas du Cr, la réduction du Cr(VI) en Cr(III) par les acides humiques n'était pas affectée par la force ionique (0,05-0,5 M) et la nature de l'électrolyte, et des facteurs, comme le pH et la température, étaient considérés plus importants (Wittbrodt et Palmer, 1996). D'une façon générale, lors de l'étude de la spéciation de l'As dans les sols organiques (agricoles ou suite à un ajout d'une source de matière organique), la force ionique serait un paramètre à considérer, comme dans le cas du Cr (Bolan *et al.*, 2003).

Néanmoins, la capacité de réduction de l'As(V) plus élevée des sols organiques C et D par rapport aux sols A et B a été confirmée. Cela est appuyé par le fait que la proportion d'As(III) dans les sols plus organiques C et D n'a pas diminué pendant 40 jours, mais par contre elle a augmenté légèrement. Ainsi, en conditions aérobies, la capacité réductrice plus élevée des sols organiques peut contrecarrer l'influence des autres facteurs qui ont déterminé l'oxydation d'As(III) dans les sols moins organiques (A et B).

Les résultats de la spéciation de l'As dans les sols en fonction du temps ne peuvent pas être comparés avec la littérature étant donné qu'à ce jour aucune étude n'a été réalisée dans le but d'évaluer le changement de spéciation de l'As dans la **phase solide** du sol et en fonction du temps. En général, les études menées sur le changement de la spéciation de l'As dans le sol se sont limitées au suivi dans le temps des formes chimiques de l'As dans la fraction soluble (Turpeinen *et al.*, 2002).



Cependant, les résultats de la présente étude pourraient être comparés avec les résultats de l'étude de Zagury et Deschênes (2002) qui est la seule à avoir évalué la spéciation de l'As dans la phase solide d'un sol contaminé par le CCA. Les sols à l'étude étaient deux sols naturels contaminés par l'As prélevés à la base de 2 poteaux traités au CCA/PEG (mis en service depuis 10 ans) qui avaient une teneur en matière organique dans une proportion similaire à celle des sols artificiels plus organiques C et D. Un sol était sablonneux et organique (environ 10,5 % M.O. exprimé en % solides volatils) et l'autre était très argileux (environ 8,2 % M.O. exprimé en % solides volatils). Ces deux sols avaient aussi un pH neutre et étaient fortement contaminés par l'As en surface ( $193 \pm 118$  mg/kg et  $397 \pm 93$  mg/kg). La détermination de la spéciation de l'As dans la phase solide par la même méthode d'extraction liquide-liquide a montré que l'As était aussi majoritairement présent sous forme d'As(V) ( $> 97\%$ ) et par conséquent moins de 3 % d'As(III) était présent (déterminé par calcul). De plus, les résultats de lavage en retour de l'As(III) ont montré que la proportion d'As(III) par site pouvait atteindre au maximum 8 à 22 % selon l'échantillon.

#### 4.3.5 Spéciation de l'As dans les extraits aqueux

Les teneurs en As total soluble (extraits à l'eau déionisée) des sols inoculés et non inoculés en fonction du temps d'incubation sont présentées au Tableau 4.11. On note que, plus le sol est organique, plus la concentration d'As total soluble est élevée (voir aussi la section 4.3.1). Au jour 1 d'incubation, la proportion de l'As total soluble dans le sol plus organique D était de  $14 \pm 1\%$ , tandis que dans le sol minéral A elle était de  $5,5 \pm 0,5\%$ . Dans les sols intermédiaires B (5 %M.O.) et C (7,5 % M.O.) (inoculés et non-inoculés) les proportions d'As total soluble sont presque similaires (6,7%- 7,8%). De plus, on note qu'il n'y avait pas de différences entre l'As total soluble des sols inoculés et des sols non-inoculés au jour 1 d'incubation.

Les proportions d'As soluble des quatre sols sont assez élevées si on les compare avec les proportions d'As soluble trouvées par Turpeinen *et al.* (2002, 2003) dans les sols

contaminés par l'As en provenance de sites d'imprégnation du bois. Ainsi, dans leur cas, les valeurs étaient comprises entre 0,1 % et 0,3 % pour des concentrations d'As total dans les sols allant de 2125 à 3632 mg/kg. Dans le cadre de la présente étude, les proportions élevées de l'As pourraient être dues au pH des sols (près de la neutralité) (Masscheleyn *et al.*, 1991) et au contenu faible en composants absorbats, soit la kaolinite (y compris les oxydes de Fe de sa composition) (Onken et Adriano, 1997).

**Tableau 4.11 Concentrations d'As total soluble (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation**

Sol	Jour 1 (%) <sup>a</sup>		Jour 5	Jour 15	Jour 40
A (I) <sup>b</sup>	38 ± 6	5,5 ± 0,5	26 ± 1	23 ± 2	19 ± 2
A(NI) <sup>c</sup>	34 ± 19	4,5 ± 0,7	25 ± 2	20 ± 2	17 <sup>d</sup>
B(I) <sup>b</sup>	46 ± 3	7 ± 1	41 ± 1	38 ± 1	26 ± 12 <sup>e</sup>
B(NI) <sup>c</sup>	44 ± 4	6,7 ± 0,3	41 ± 1	38 ± 0	32 ± 1
C(I) <sup>b</sup>	55 ± 2	7,8 ± 0,6	50 ± 2	44 ± 2	46 ± 2
C(NI) <sup>c</sup>	52 ± 5	7 ± 0,6	50 ± 1	45 ± 1	44 ± 2
D(I) <sup>b</sup>	100 ± 3	14 ± 1	109 ± 3	100 ± 2	100 ± 3
D(NI) <sup>d</sup>	108	14	110	110	104

<sup>a</sup> % As total soluble = conc. As total soluble\*100 / conc. As total dans le sol au jour 1  
(conc. As total dans le sol au jour 1 = As(III) back-wash + As(V))

<sup>b</sup>: moyenne ± écart type (n=3)

<sup>c,e</sup>: moyenne ± RPD% (n=2)

<sup>d</sup>: un réplicat

La concentration d'As total soluble était corrélée au jour 1 d'incubation avec la concentration de COD du sol et n'était pas corrélée avec la concentration de l'As total

des sols (mg/kg) (voir la section 4.3.1). L'importance du COD, comme paramètre susceptible de mobiliser l'As dans le sol a été mise en évidence par des travaux récents (Kalbitz et Wennrich, 1998; Grafe *et al.*, 2001 ; Redman *et al.*, 2002).

Dans le temps (voir le Tableau 4.11), la concentration de l'As total soluble (sous la forme majoritaire de l'As(V), voir le tableau 4.12) diminue dans les sols moins organiques A (environ 50 %) et B (environ 43 %). Une diminution de l'As(V) et l'As(III) solubles pendant le temps était observée aussi par Onken et Adriano (1997) dans un sol non-saturé et à un pH=4,5. Cette diminution était expliquée par une possible conversion de l'As(V) et l'As(III) dans des formes insolubles. En revanche dans les sols plus organiques C et D la concentration de l'As total soluble est restée constante pendant le temps.

La stabilité de l'As(V) soluble dans les sols C et D pendant le temps pourrait être liée à un effet de compétition entre les anions organiques (COD) et l'As dans la solution du sol pour les sites d'adsorption dans le sol (Lin *et al.*, 2002; Redman *et al.*, 2002). On note aussi que la concentration de l'As soluble n'a pas augmenté dans le temps suite à l'augmentation de COD dans les sols plus organiques C et D (voir le Tableau 4.7).

De plus, il faut noter que l'As est l'élément le plus soluble par rapport aux Cr et Cu dans tous les sols (voir le Tableau D6 en Annexe D). Toutefois, dans le sol A, la proportion de l'élément soluble suit l'ordre suivant :  $As > Cr > Cu$ , par rapport aux sols organiques (B, C et D) ou l'ordre est :  $As > Cu > Cr$ .

#### **a) As(V) soluble**

Les résultats de la spéciation de l'As soluble, soit les concentrations d'As(III) et As(V)) solubles en fonction du temps sont présentés au Tableau 4.12. Les concentrations des formes méthylées, MMAA et DMAA étaient inférieures à la limite de détection pendant

40 jours d'incubation. La somme de formes chimiques solubles, As(V) et As(III), était comprise entre 88-107 % de l'As total soluble.

Les tableaux 4.11 et 4.12 indiquent que la forme chimique majoritaire de l'As total soluble dans les quatre sols pendant toute la période d'incubation était l'As (V), ce qui est conforme aux conditions redox aérobies. Toutefois, on note que plus le sol est organique, plus la concentration d'As(V) soluble est élevée. Ainsi, une corrélation positive a été trouvée (au jour 1 d'incubation) entre la concentration de COD des sols (mg/kg) et la concentration d'As (V) soluble (mg/kg) ( $r^2=0,86$ ,  $n=8$ ). On note aussi qu'il n'existait pas une corrélation entre la concentration totale d'As (V) des sols (inoculés et non-inoculés) et la concentration d'As(V) soluble ( $r^2=0,02$ ,  $n=8$ ) (voir le Tableau 4.9).

Pendant 40 jours d'incubation aérobie, la teneur en matière organique n'a pas influencé la réduction biotique de l'As(V) soluble en As(III). Par contre (voir la section suivante) la concentration d'As(III) soluble a diminué pendant le temps dans tous les sols. Il semble que l'activité microbienne corroborée par la croissance des hétérotrophes totaux et tolérants à l'As(V) dans les sols organiques C et D n'a pas influencé la réduction biotique de l'As(V) soluble en As(III).

Les résultats de la spéciation de l'As soluble sont en accord avec l'étude de Turpeinen *et al.* (2002). Ces derniers ont étudié l'influence d'une source de carbone supplémentaire facilement biodégradable (0,2 % de glucose) sur la spéciation de l'As soluble, et ceci dans le cas de sols naturels contaminés par l'As en provenance des sites d'imprégnation du bois par le CCA. Les auteurs ont conclu que dans des sols (saturés), l'ajout de glucose, n'a pas influencé significativement la réduction biotique et abiotique de l'As(V) soluble en As(III) pendant le temps, tant en conditions aérobies qu'anaérobies.

Les résultats de la présente étude sont en accord, aussi, avec l'étude de Macur *et al.* (2004) qui ont conclu que dans le cas d'un sol contaminé par l'As(V) ( $\text{NaH}_2\text{AsO}_4$ ), en

présence de glucose et en conditions non saturées, la réduction de l'As(V) soluble n'a pas eu lieu pendant 16 jours d'incubation aérobie.

**Tableau 4.12 Spéciation de l'As dans les extraits aqueux (mg/kg sol sec) en fonction du temps d'incubation**

Sol	As(III)				As(V)			
	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40
A(I) <sup>a</sup>	< LDR	< LDR	0,01 ± 0,01 <sup>d</sup>	< LDR	31 ± 14	24 ± 2	23 ± 2	16 ± 2
A(III) <sup>b</sup>	< LDR	< LDR	< LDR	< LDR	35 ± 16	24 ± 12	25 ± 23	17 ± 0,2
B(I) <sup>a</sup>	0,3 ± 7 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,03 ± 52 <sup>d</sup>	< LDR	46 ± 2	40 ± 2	40 ± 2	34 ± 2
B(III) <sup>b</sup>	0,1 ± 0,0	0,08 ± 0,8	0,48 ± 169	< LDR	44 ± 4	40 ± 6	38 ± 4	32 ± 0,6
C(I) <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1	0,02 ± 0,01	0,003 ± 0,003 <sup>d</sup>	< LDR	52 ± 1	52 ± 2	48 ± 1	45 ± 2
C(III) <sup>b</sup>	0,2 ± 90	1,9 ± 188	< LDR	< LDR	50 ± 1	50 ± 5	46 <sup>e</sup>	44 ± 2
D(I) <sup>a</sup>	2,8 ± 0,4	0,04 ± 0,06 <sup>e</sup>	0,07 ± 1,2 <sup>d</sup>	< LDR	101 ± 2	98 ± 2	96 ± 1	100 ± 3
D(III) <sup>c</sup>	3,1	1,8	< LDR	< LDR	101	102	106	104

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)

<sup>b</sup> : moyenne ± RPD% (n=2)

<sup>c</sup> : un réplicat

<sup>d</sup> : 2 valeurs sur 3 étaient < LDR (0,03 µg/l). Pour faciliter le calcul statistique, la valeur de la concentration de l'As(III) < LDR a été considérée égale à la moitié de la valeur de la LDR (Chirenje *et al.*, 2003).

<sup>e</sup> : 1 valeur sur 3 était < LDR (0,03 µg/l)

Des facteurs présents dans les sols naturels, comme le manque de microorganismes spécifiques de détoxification, la présence de concentrations trop élevées de l'As soluble ou de Cu et Cr (toxiques pour les microorganismes ou qui inhibent les réactions redox), le pH, la présence d'autres éléments redox (par exemple le Cr(VI)), sont tous susceptibles d'affecter la réduction de l'As(V) soluble par la matière organique dans des sols contaminés par le CCA. D'ailleurs, si une concentration plus élevée d'As total soluble est un facteur limitant la réduction d'As(V), les sols organiques sont les plus susceptibles de favoriser une telle concentration. La force ionique serait un autre paramètre susceptible à considérer, lorsqu'on évalue l'influence de la matière organique sur la spéciation de l'As soluble. Ainsi, elle a été un paramètre des conditions du travail (0,01M NaCl) lors de l'étude de Redman *et al.* (2002) sur l'influence de la matière organique dissoute sur la réduction de l'As(V) soluble en As(III). Cependant, selon Wittbrodt et Palmer (1996) la réduction du Cr(VI) en Cr(III) par les acides fulviques (la fraction de la matière organique soluble à tous le pH) n'a pas été affectée ni par la force ionique (0,05M-0,5 M) ni par la nature de l'électrolyte.

Outre l'influence de la teneur en matière organique du sol sur la spéciation de l'As soluble, les valeurs du Tableau 4.12, donnent un aperçu sur la stabilité des concentrations d'As(III) et d'As(V) solubles en fonction du temps.

Pendant 40 jours d'incubation, la concentration d'As(V) soluble a diminué dans les sols moins organiques A (environ 39 %) et B (environ 16 %), tandis que dans les sols plus organiques C et D elle est restée stable dû probablement à la présence des anions organiques (COD) qui entrent en compétition avec l'adsorption de l'As dans le sol (Redman *et al.*, 2002). La force ionique est aussi un paramètre à considérer lors de l'étude de la rétention de l'As dans les sols. En général, ce paramètre est plus susceptible d'affecter la rétention de l'As(V) dans le sol que la rétention de l'As(III). Selon l'étude de Khaodhiar *et al.* (2000), la rétention du Cu, du Cr et de l'As dans un sol sablonneux (contenant des oxydes de Fe) à un pH constant (pH=5-7,5) n'était pas

influencée par la présence d'électrolyte sous la forme de  $\text{NaNO}_3$  à des concentrations allant de 0,01 M à 0,10 M. Dans notre cas, l'effet des ions chlorure, provenant de l'inoculum, sur la rétention de l'As dans le sol serait similaire à celui des ions nitrate, les deux ayant un effet négligeable sur la rétention de l'As dans le sol (Chen, 1994; Yan-Chu, 1994).

Les tableaux 4.11 et 4.12 indiquent également que l'évolution temporelle de l'As total soluble sous la forme majoritaire d'As (V) dans les sols inoculés était similaire à l'évolution temporelle de l'As total soluble dans les sols non inoculés, sa concentration a soit diminué pendant le temps (sols A et B), soit elle est restée stable (sols C et D). En conséquence on peut conclure que l'activité microbienne des sols inoculés et non-inoculés n'a pas influencé le lessivage de l'As dans le temps. Toutefois, selon Turpeinen *et al.* (1999), l'ajout d'une source de carbone plus facilement biodégradable (glucose 0,2 %) aux sols a entraîné un lessivage biologique plus rapide de l'As sous forme de l'As(V) (dans 3 sols sur 4 étudiés) et ceci pendant 5 jours d'incubation. Sans addition de glucose, la mobilisation de l'As(V) en présence de microorganismes était plus lente et a eu lieu dans une plus faible proportion, soit 6 % par rapport à 19-24 % avec l'addition du glucose. Dans le cadre de la présente étude, la source de carbone organique, qui était moins biodégradable que le glucose, et qui était déjà un constituant du sol avant la contamination, n'a pas été capable d'induire une activité microbienne suffisamment grande (dans les sols inoculés et non-inoculés) pour que la mobilisation de l'As(V) ait lieu pendant la période d'incubation par une diminution du potentiel redox.

#### **b) As(III) soluble**

Selon le Tableau 4.12, l'As(III) soluble était présent dans les sols B, C et D, tandis que dans le sol A (malgré une concentration totale d'As(III) dans le sol d'environ  $24 \pm 6$  mg/kg, voir le Tableau 4.9), la concentration d'As(III) soluble était inférieure à la limite de détection (0,001 mg/l) pendant toute la période d'incubation. Ainsi, l'As(III) était retenu dans le sol A. Au jour 1 d'incubation, les concentrations d'As(III) soluble dans



les sols B, C et D étaient très faibles par rapport aux concentrations de l'As(V) soluble. Ainsi, dans les sols intermédiaires B et C (inoculés) les concentrations d'As(III) soluble étaient similaires, soit  $0,3 \pm 7\%$  mg/kg sol B et  $0,6 \pm 0,1$  mg/kg sol C. Dans le sol le plus organique D, la concentration d'As(III) soluble était plus élevée, soit égale à  $2,8 \pm 0,4$  mg/kg sol.

Les faibles concentrations d'As(III) soluble dans les sols B,C et D pourraient être dues à une forte rétention de l'As(III) sur les acides humiques, favorisée par le pH des sols autour de la neutralité. En général, la rétention de l'As(III) sur les acides humiques a lieu à un pH plus élevé que dans le cas de l'As(V), dont la rétention sur les acides humiques est maximale à un pH=5,5 (Smith *et al.*, 1998).

Au jour 1 d'incubation une corrélation positive a été trouvée entre la concentration de COD dans le sol (mg/kg sol) (voir le Tableau 4.7) et la concentration d'As(III) soluble dans le sol ( $r^2=0,88$ ,  $n=8$ ). De plus, une corrélation entre la concentration totale d'As(III) des sols (voir le Tableau 4.9) et la concentration d'As(III) soluble n'a pas été trouvée ( $r^2=0,08$ ,  $n=6$ ). Ainsi, la teneur en matière organique dissoute (COD) semble être un facteur important pour la solubilisation de l'As(III) dans le sol.

Selon le Tableau 4.12 on note qu'une augmentation importante de la teneur en matière organique du sol, soit de 7,5 % à 15 % a influencé plus la solubilisation de l'As(III) dans le sol que la solubilisation de l'As(V). En effet, au jour 1 d'incubation la concentration d'As(III) soluble est environ 5 fois plus élevée dans le sol le plus organique D que dans le sol C, tandis que la concentration d'As(V) soluble est environ 2 fois plus élevée dans le sol D par rapport au sol C. Cette conclusion est en accord avec Redman *et al.* (2002) qui ont montré pour la première fois que la matière organique dissoute était un facteur plus important dans la solubilisation de l'As(III) (adsorbé préalablement sur l'hématite) que de l'As(V).

Cependant, dans le temps (voir le tableau 4.12), la concentration d'As(III) soluble n'est pas stable, elle diminue après 40 jours dans les sols B, C, D, (inoculés et non inoculés) à la limite de détection (0,001 mg/l), ce qui est en concordance avec les conditions redox aérobies. Toutefois, dans les sols inoculés la diminution de l'As(III) est plus importante dans les premiers 5 jours d'incubation. De plus, on note que plus le sol inoculé est organique, plus la diminution d'As(III) soluble entre le jour 1 et 5 est rapide, soit d'environ 15 fois dans le sol B, 30 fois dans le sol C et 70 fois dans le sol D. Cette tendance est inverse au cas de la diminution de l'As(V) soluble pendant le temps, ce qui nous mène à croire que probablement dans les sols inoculés il y a eu de facteurs biotiques qui ont influencé la diminution de l'As(III) dans les sols. En conséquence, dans notre cas, la présence des micro-organismes inoculés, semble être un facteur catalyseur dans la diminution de l'As(III) soluble pendant le temps, et qui a probablement favorisé son oxydation en As(V). Aussi, il semble que plus la teneur en matière organique augmente, plus l'oxydation biologique d'As(III) est favorisée, probablement dû à une activité microbienne plus intense, ce qui est en accord avec les résultats de dénombrements des hétérotrophes totaux (voir le Tableau 4.4). Cependant, le mécanisme d'oxydation biologique ne peut pas être vérifié par un bilan de masse dans la fraction soluble, étant donné que les concentrations d'As(III) soluble sont très faibles par rapport aux concentrations d'As(V) soluble.

L'oxydation biologique de l'As(III) soluble dans les sols inoculés est en accord avec l'étude de Macur *et al.* (2004) menée, en conditions aérobies, et en colonne pendant 16 jours. Ainsi, dans un sol non-saturé contaminé par du  $\text{NaH}_2\text{AsO}_3$  (en présence de glucose) une oxydation de l'As(III) de l'effluent a eu lieu rapidement (3 jours) en présence de micro-organismes par un mécanisme de detoxification. De plus, dans le cadre de cette étude, l'oxydation de l'As(III) soluble n'a pas été observée en absence des micro-organismes (sol stérile).

Une diminution de l'As(III) soluble par une oxydation de l'As(III) pendant l'extraction à l'eau déionisée à un pH de 5,8, ou pendant la période de conservation, est improbable. Ainsi, selon Pansar-Kallio et Manninen (1997), l'état d'oxydation de l'As(III) et de l'As(V) solubles restent stables, lorsqu'ils sont extraits par des agents d'extractions de pH = 3-9. De plus, la conservation des échantillons à 4<sup>0</sup> C et l'analyse de la spéciation de l'As soluble dans les délais raisonnables (environ une semaine) permettent d'écarter cette possibilité de pertes pendant la manipulation.

En résumé, dans le cadre du projet, la teneur en matière organique du sol n'a pas été un facteur de non équilibre; elle n'a pas entraîné la formation d'As(III) soluble pendant le temps. La forme majoritaire de l'As soluble dans tous les sols, pendant 40 jours d'incubation aérobie, est restée l'As(V) ce qui est conforme aux conditions redox aérobies. Le danger écotoxicologique des sols plus organiques contaminés par l'As serait lié à la présence d'une concentration plus élevée d'As total soluble. De plus, dans un sol de surface organique et sablonneux, l'As soluble (sous la forme majoritaire d'As(V)) serait plus disponible pour la mobilisation dans les couches plus profondes du sol, où un potentiel redox plus faible sera favorable à la réduction de l'As(V) soluble en As(III).

Ainsi, les résultats des travaux de Zagury et Deschênes (2002) ont montré que l'As(III) était présent dans l'eau souterraine à la base des poteaux traités au CCA/PEG sur deux sites de pH neutre avec des teneurs en solides volatils élevées, soit environ 12 % et 30 %. Sur le premier site, les proportions d'As(III) variaient entre 30 et 44 % de l'As total, alors qu'elles variaient entre 71 et 100 % sur le deuxième site.

### c) Composés méthylés solubles MMAA et DMAA

Les concentrations des composés méthylés solubles, MMAA et DMAA, mesurées par HPLC-ICP-MS dans les 4 sols pendant la période d'incubation étaient inférieures à la limite de détection rapportée, soit 0,0007-0,001 mg/l pour MMAA et 0,001 mg/l pour DMAA. Par conséquence, dans notre cas, la teneur en matière organique n'a pas influencé la méthylation de l'As soluble et la détoxification des sols n'a pas eu lieu par ce mécanisme.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Turpeinen *et al.* (2002) menée sur des sols contaminés en provenance de sites d'imprégnation du bois. Dans le cadre de cette étude, l'ajout d'une source supplémentaire de carbone biodisponible, soit le glucose (0,2 %) n'a pas augmenté la concentration des MMAA et DMAA dans la fraction soluble. D'ailleurs, seule une très faible méthylation a été observée par Turpeinen *et al.* (1999, 2002), dans les sols naturels contaminés au CCA, en conditions de laboratoire, et ceci pendant une période d'incubation aérobie de 10 jours. Ainsi, la concentration de composés méthylés était inférieure à 0,8 mg/kg.

En général, il est bien connu que la méthylation de l'As soluble est due exclusivement à l'activité microbienne qui est influencée par une série de facteurs environnementaux. Dans notre cas, malgré un pH optimal pour l'activité microbienne, l'absence de composés méthylés solubles dans les sols peut être liée à différents facteurs. Un facteur limitant pour la méthylation aurait pu être la concentration d'As (III) soluble qui a diminué dans le temps, la concentration de l'As total soluble, ou l'absence des microorganismes spécifiques dans la microflore inoculée.

## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET RECOMMANDATIONS

#### 5.1 Conclusions générales

En vue d'évaluer l'impact écotoxicologique d'un sol contaminé par l'As où la source de contamination est le CCA, la connaissance des facteurs qui influencent la formation de l'As(III) (la forme plus toxique et plus mobile dans le sol) et des composés méthylés, soit MMAA et DMAA (moins toxiques) dans le sol est essentielle. Dans ce contexte, le présent projet visait à évaluer en conditions aérobies, l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par le CCA sur la formation de l'As(III) par la réduction de l'As(V) et sur le processus de méthylation de l'As.

La méthodologie proposée pour répondre à cet objectif était divisée en trois parties: le choix de la matière organique à utiliser dans les sols synthétiques, la constitution des 4 sols synthétiques et leur contamination par une solution de CCA de type C, et les essais en macrocosmes. Les essais en macrocosmes ont été menés pendant 40 jours d'incubation aérobies, sur des sols biotiques et abiotiques et en conditions non-saturées. Ainsi, l'influence de la teneur en matière organique du sol sur la spéciation de l'As a été étudiée dans le cas des sols contaminés ayant une source identique de matière organique et avec une teneur dans le sol qui variait de 0,5 % à 15 %.

La caractérisation physico-chimique des sols a montré que la teneur en matière organique du sol n'influencait pas la rétention de l'As dans les sols. Selon les résultats des essais en macrocosmes, une teneur en matière organique du sol  $\geq 5$  % a entraîné une réduction de l'As(V) en As(III) dans la phase solide du sol avant les essais en macrocosmes, pendant la période de contamination. Pendant 40 jours d'incubation aérobie, la forme chimique prédominante de l'As dans tous les sols était l'As(V), ce qui est en accord avec les conditions redox aérobies présentes. Toutefois, pendant 40 jours,

une teneur en matière organique  $\geq 7,5$  % a favorisé une faible réduction de l'As(V) en As(III). Ainsi, une augmentation d'environ 3 % de la proportion d'As(III) dans les sols organiques (C et D) a été observée. La conclusion que la teneur en matière organique du sol influence la formation de l'As(III) dans le sol est appuyée par l'évolution de l'As(III) dans les sols moins organiques (0,5-5 % M.O.) pendant le temps. En effet, par opposition aux sols organiques, une diminution de l'As(III) en fonction du temps a été observée, ce qui indique que la spéciation de l'As dans les sols moins organiques semble être gouvernée par les conditions redox.

En revanche, pendant 40 jours d'incubation, la teneur en matière organique du sol n'a pas entraîné la réduction de l'As(V) soluble en As(III), et dans notre cas, ni la formation des formes méthylées solubles de l'As, soit MMAA et DMAA qui étaient toujours sous la limite de détection. La forme majoritaire de l'As soluble dans tous les sols était l'As(V) conformément aux conditions redox aérobies. En conséquence, la teneur en matière organique n'a pas été un facteur de non équilibre dans le sol. Toutefois, il semble qu'en présence des micro-organismes, une teneur plus élevée en matière organique a accéléré la diminution d'As(III) soluble, probablement due à une oxydation biologique de l'As(III) en As(V).

Les résultats des essais en macrocosmes ont également permis de mettre en évidence que la concentration totale d'As dans le sol n'était pas un indicateur fiable pour la prédiction de l'As total soluble dans le sol. La teneur en matière organique du sol via le COD (dans les sols ayant un faible contenu en oxydes de Fe), s'est avérée un paramètre qui a entraîné la solubilisation de l'As dans le sol (sous la forme majoritaire de l'As(V)). De plus, une augmentation importante de la teneur en matière organique, soit de 7,5 % à 15% semble avoir influencé plus la solubilisation de l'As(III) que celle de l'As(V). Malgré cela, en conditions aérobies, les sols plus organiques présentent un faible danger écotoxicologique relatif à l'As(III) soluble. Cela réside en sa faible concentration et sa réactivité, l'As(III) étant facilement soumis à une oxydation (biologique et/ou abiotique)

pendant le temps. En revanche une teneur en matière organique  $\geq 7,5$  % a augmenté la stabilité de l'As(V) soluble dans le sol pendant le temps. En conséquence, dans les sols aérobie plus organiques, le danger écotoxicologique serait plutôt lié, à une proportion d'As (V) soluble plus élevée. D'autre part, dans les sols plus organiques, l'As(V) semble être plus disponible pour se prêter à des phénomènes de transport et de transformation par sa réduction en As(III) dans les couches plus profondes du sol.

## 5.2 Recommandations

Les recommandations concernent dans un premier temps des améliorations à apporter pour maintenir les conditions stériles des sols abiotiques, compte tenu de la croissance des micro-organismes observés pendant la période d'incubation dans les sols abiotiques stérilisés par radiations gamma. Si une inoculation des sols à l'étude avec une microflore externe est envisagée, une filtration de l'air pendant l'aération des macrocosmes contenant les sols abiotiques et stérilisés par radiations gamma est recommandée. Dans le cas d'une évaluation comparative entre l'influence de la matière organique sur la réduction abiotique d'As(V) en As(III) et sur la réduction biotique d'As(V) en présence de micro-organismes indigènes du sol, il est recommandé que les sols soient stérilisés par le formaldéhyde (e.g. 0,04%). Le formaldéhyde est un inhibiteur de l'activité microbienne des sols qui n'entraîne pas de changements au niveau de nutriments dissous dans le sol et ni du pH du sol (Turpeinen *et al.*, 1999). Ces paramètres doivent être similaires dans le cas où une comparaison entre l'influence de la matière organique sur la spéciation de l'As en conditions biotiques et abiotiques doit être faite. Dans un deuxième temps, les recommandations concernent l'application d'une méthode d'analyse de la spéciation de l'As plus sensible aux variations de concentrations de l'As(III) et l'As(V) pendant le temps.

Pour des analyses plus approfondies, il serait intéressant d'évaluer l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par le CCA sur la spéciation de l'As et sur son potentiel de mobilisation, en présence de plusieurs sources de matière organique. De plus, en vue de mieux évaluer l'influence de la teneur en matière organique sur le potentiel de mobilisation de l'As dans le sol, les études en colonnes seraient une approche intéressante. Les résultats en batch ont indiqué pour des conditions de transport nonidéales (conditions statiques) un potentiel de mobilisation de l'As plus élevé dans les sols aérobies plus organiques. Des études en colonnes qui reflètent des conditions dynamiques de transport, et menées toujours en conditions non-saturées, pourraient donner des informations sur l'influence des équilibres d'adsorption /desorption de l'As et du COD dans les sols riches en matière organique sur la mobilisation de l'As.

Également, des études comparatives de l'influence de la matière organique sur la réduction d'As(V) en As(III) mériteraient d'être effectuées dans le cas de deux scénarios retrouvés dans la nature : sol contaminé par du CCA ou la matière organique est déjà un constituant du sol, par rapport à un sol contaminé par du CCA où on ajoute une source supplémentaire de matière organique.

En ce qui concerne la multitude des facteurs susceptibles d'influencer la réduction d'As(V) en As(III) par la matière organique dans des sols contaminés par le CCA, l'étude de quatre facteurs d'influence mériterait plus d'attention, soit le pH, la force ionique, la présence du Cr et le facteur temps. Concernant, le Cr, il serait intéressant de suivre sa spéciation tant dans le sol que dans la phase soluble, parallèlement avec la spéciation de l'As. Concernant le facteur temps, une procédure plus courte de contamination des sols par du CCA serait recommandée dans les cadres des études proposées.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AHMANN, D. (1994). Microbe grows by reducing arsenic. Nature, 371, 750.

AHMANN, D., KRUMHOLZ, L.H., LOVLEY, D., HEMOND, H.F. et MOREL, M. (1997). Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona Watershed. Environmental Science and Technology, 31, 2923-2930.

ALLISON, F.E. (1973). Soil organic matter and its role in crop production. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., États -Unis.

ANDERSEN, S., RASMUSSEN, G., SNILSBERG, P., AMUNDSEN, C.E. et WESTBY, T. (1996). Assessing toxicity and mobilization of impregnation salts at a contaminated site. Fresenius J. Anal. Chem, 354, 676-680.

ASTM D 2976 (1996). Standard test method for pH of peat materials, vol. Soil and Rock, 288.

ASTM D 4972 (1995). Standard test method for pH of soils, vol. Soil and Rock, 27.

ASTM D 2216-92 (1998). Test method for laboratory determination of water (moisture) content of soil and rock. Philadelphia, Pa.

BAATH, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). Water, Air, and Soil Pollution, 47, 335-379.

BALASOIU, C. (2001). Influence de la composition des sols sur la spéciation et la toxicité du chrome, du cuivre et de l'arsenic dans les sols contaminés par du CCA. Mémoire de maîtrise. Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal, Québec, 159p.

BALASOIU, C., ZAGURY, G.J. et DESCHÊNES, L. (2001). Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. The Science of the Total Environment, 280, 239-255.

BERNAL, M.P., SANCHEZ-MONEDERO, M.A., PAREDES, C. et ROIG, A. (1998). Carbon mineralisation from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. Agriculture Ecosystems and Environment, 69, 179-189.

BHATTACHARYA, P., MUKHERJEE, A.B., JACKS, G. et NORDQVIST, S. (2002). Metal contamination at a wood preservation site: characterization and experimental studies on remediation. The Science of the Total Environment, 290, 165-1809.

BHUMBLA, D.K. et KEEFER, R.F. (1994). Arsenic mobilisation and bioavailability in soils. In Arsenic in the environment, Part I: Cycling and Characterisation, J.O. Nriagu, ed., Wiley & Sons, New York, 51-82.

BISSEN, M. et FRIMMEL, F.H. (2000). Speciation of As(III), As(V), MMA et DMA in contaminated soil extracts by HPLC-ICP-MS. Fresenius J. Anal. Chem, 367, 51-55.

BOHN, H. et MCNEAL, B.L. (1937). Soil Chemistry. Wiley & Sons, 1979, New York, 319p.

BOLAN, N.S., ADRIANO, D.C., NATESAN, R. et KOO, B.J. (2003). Effects of organic amendments on the reduction and phytoavailability of chromate in mineral soil. Journal of Environmental Quality, 32, 120-128.

BOWELL, R. J., MORLEY N.H. et DIN V.K. (1994). Arsenic speciation in soil porewaters from the Ashanti Mine, Ghana. Applied Geochemistry, 9, 15-22.

BOWELL, R. J. (1994). Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydroxides in soils. Applied Geochemistry, 9, 279-286.

BURFORD, J.R. et BREMNER, J.M. (1975). Relationship between the denitrification capacities of soils and total, water-soluble and readily decomposable soil organic matter. Soil. Biol. Biochem., 7, 389-394.

CAI, J. et DUBOW, M.S. (1997). Use of luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA). Biodegradation, 8, 105-111.

CAI, Y., CABRERA, J.C., GEORGIADIS, M. et JAYACHANDRAN, K. (2002). Assesment of arsenic mobility in the soils of some golf courses in South Florida. The Science of the Total Environment, 291, 123-134.

CARBONELL-BARRACHINA, A., JUGSUIJINDA, A., BURLO, F., DELAUNE, R.D. et PATRICK, W.H. JR (1999). Arsenic chemistry in municipal sewage sludge as affected by redox potential and pH. Water Research, 34, No 1, 216-224.

CAREY, P.L., MCLAREN, R.G. et ADAMS, J.A. (1996). Sorption of cupric, dichromate and arsenate ions in some New Zealand soils. Water, Air, and Soil Pollution, 87, 189-203.

CAUSSY, D. (2003). Case studies of the impact of understanding bioavailability of arsenic. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56, 164-173.

CERVANTES, C., GUANYONG, J., RAMIREZ, J.L. et SILVER, S. (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 15, 355-367.

CHAPPELL, J., CHISWELL, B. et OLSZOWY, H. (1995). Speciation of arsenic in a contaminated soil by solvent extraction, Talanta, 42, 323-329.

CHEFETZ, B., HATCHER, P., HADAR, Y. et CHEN, Y. (1996). Chemical and biological characterization of organic matter during composting of municipal solid waste. Journal of Environmental Quality, 25, 776-785.

CHEN, T. (1994). Arsenate adsorption in soil and its mechanism. China Environmental Science, 5, No 1, 85-91.

CHIRENJE, T., MA, L.Q., CLARK, C. et REEVES, M. (2003). Cu, Cr and As distribution in soils adjacent to pressure –treated decks, fences and poles. Environmental Pollution, 124, No 3, 407-417.

CHIU, V.Q. et HERING, J.G. (2000). Arsenic adsorption and oxidation at manganite surfaces. 1. Method for simultaneous determination of adsorbed and dissolved arsenic species. Environmental Science and Technology, 34, 2029-2034.

COOK, B. D. et ALLAN, D.L. (1992). Dissolved organic carbon in old field soils: total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. Soil Biol. Biochem., 24, No 6, 585-594.

CORNU, S., SAADA, A., BREEZE, D., GAUTHIER, S. et BARANGER P. (1999). The influence of organiques complexes on arsenic adsorption onto kaolinites. Geomaterials, 328, 649-654.

CULLEN, W.R. et REIMER, K.J. (1989). Arsenic speciation in the environment, Chemical Review, 89, 713-764.

CUMMINGS, D. E., CACCAVO, F., FENDORF, S. et ROSENZWEIG, R.F. (1999). Arsenic mobilization by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY. Environmental Science and Technology, 33, 723-729.

DIXIT, S. et HERING, J.G. (2003). Comparison of arsenic (V) and arsenic (III) sorption onto iron oxide minerals: Implications for arsenic mobility. Environmental Science and Technology, 37, 4182-4189.

DOU, Z., GALLIGAN, R.D. et ALLSHOUSE (2001). Manure sampling for nutrient analysis: variability and sampling efficacy. Journal of Environmental Quality, 30, 1432-1437.

DOWDLE, P.R., LAVERMAN, A.M. et OREMLAND, R.S. (1996). Bacterial dissimilatory reduction of arsenic (V) to arsenic (III) in anoxic sediments. Applied and Environmental Microbiology, May, 1664-1669.

ESSINGTON, M.E. (2004). In Soil and water chemistry: an integrative approach. Boca Raton, 534p.

FITZ, W.J. et WENZEL, W.W. (2002). Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. Journal of Biotechnology, 99, 259-278.

FLYNN, C.H., MAHON, V.M., CHONG, D. DEMERGASSO, C.S., CORISIER, P., MEHARG, A.A. et PATON, G.I. (2002). Assessment of bioavailable arsenic and copper in soils and sediments from the Antofagasta region of northern Chile. The Science of the Total Environment, 286, 51-59.

FRANKENBERGER, W.T. et ARSHAD, M. (1992). Volatilisation of arsenic. In Environmental chemistry of arsenic. Frankenberger, W.T., University of California, 363-375.

GOERING, H.K. et VAN SOEST, P.J. (1970). Forage Fiber Analyses. Agricultural Handbook, No 379, U.S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C. USA, 1-20.

GOLDBERG, S. (2002). Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals. Soil Sci. Am. J., 66, 413-421.

GOMEZ, A.J.L., MORALES, E., SANCHEZ-RODAS, D. et GIRALDEZ, I. (2000). Stability of chemical species in environmental matrices. Trends in a analytical chemistry, 19, No 2+3, 200-209.

GONG, Z., LU, X., MA, M., WATT, C., X. et LE, C. (2002). Arsenic speciation analysis. Talanta, 58, 77-96.

GRAFE, M., EICK, M.J. et GROSSL, P.R. (2001). Adsorption of arsenate (V) and arsenite (III) on goethite in the presence and absence of dissolved organic carbon. Soil Sci. Soc. Am. J., 65, 1680 -1687.

HARTER, R.D. et NAIDU, R. (2001). An assesement on environmental and solution parameter impact on trace metal sorbtion by soils. Soil Science Society of American Journal, 65, No.3, 597-612.

HERREWEGHE, S.V., SWENNEN, R., VANDECASTEELE, C. et CAPPUYNS, V. (2003). Solid phase speciation of arsenic by sequential extraction in standard reference materials and industrially contaminated soil samples. Environmental Pollution, 122, 323-342.

HINGSTON, J.A., COLLINS, C.D., MURPHY, R.J. et LESTER, J.N. (2001). Leaching of chromated copper arsenate wood preservative: a review. Environmental Pollution, 111, 53-66.

HUGHES, M.F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicology Letters, 133, 1-16.

HSU, J.H. et LO, S. L. (2001). Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese and zinc from swine manure. Environmental Pollution, 114, 119-127.

INSKEEP, W.P., JONES C.A., MACUR J.R.E. et LAGNER, H.W. (1999). Rates of arsenic oxidation-reduction reactions in contaminated soils: Effects on arsenic fate and mobility. EPA Final Report.

INSKEEP, W.P., MCDERMOTT, T.R., FENDOR, S. et FRANKENBERGER, W.T. JR. (2002). Arsenic (V) /(III) cycling in soils and natural waters and microbiological processes. In Environmental chemistry of arsenic. Frankenberger, W.T., Jr, University of California , 183- 209.

JAIN, C.K. et ALI, I. (2000). Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. Water Research, 34, No 17, 4304-4312.

JANDL, P. et SOLLINS, P. (1997). Water-extractable soil carbon in relation to the belowground carbon cycle. Biol. Fertil. Soils, 25, 196-201.

JONES, C.A. (1998). Process controlling arsenic solubility and mobility in soils. Thèse de doctorat, Montana State University -Bozeman, États-Unis.

JONES, C.A., INSKEEP, W.P. et NEUMAN, D.R. (1997). Arsenic transport in contaminated mine tailings following liming. Journal of Environmental Quality, 26, 433-439.

JONES, C.A., INSKEEP, W.P., BAUDER, J.W. et KEITH, K.E. (1999). Arsenic solubility and attenuation in soils of the Madison River Basin, Montana: Impacts of long-term irrigation. Journal of Environmental Quality, 28, 1314-1320.

JONES, C.A., LANGNER, H., ANDERSON, K., MCDERMOTT, T.R. et INSKEEP, W. (2000). Rates of microbially mediated arsenate reduction and solubilization, Soil Sci. Soc. Am. J., 64, 600-608.

KALBITZ, K. et GEYER, S. (2002). Different effects of peat degradation on dissolved organic carbon and nitrogen. Organic Geochemistry, 33, 319-326.

KALBITZ, K. et WENNRICH, R. (1998). Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. The Science of the Total Environment, 209, 27-39.

KAMADA, T. (1976). Selective determination of arsenic (III) and arsenic (V) with ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, sodium diethyldithiocarbamate and dithiozone by means of flameless atomic-absorption spectrophotometry with a carbon-tube atomizer. Talanta, 23, 835-839.

KARAM, A. (1993). Chemical properties of organic soils. In M.R. Carter (ed) Soils sampling and methods of analysis. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 459-471.

KHAODHIAR, S., AZIZIAN, M.F., AOSATHAPHAN, K. et NELSON, P.O. (2000). Copper, chromium and arsenic adsorption and equilibrium modeling in an iron-oxide-



coated sand, background electrolyte system. Water, Air, and Soil Pollution, 119, 105-120.

KINGSLEY, M.T., et BOHLOOL, B. (1981). Release of Rhizobium spp. From Tropical soils and Recovery for Immunofluorescence Enumeration. Applied and Environmental Microbiology, 42, No 2, 241-246.

KOZUH, N.S., STUPAR, J. et GORENC, B. (2000). Reduction and oxidation processes of chromium in soils. Environmental Science and Technology, 34, 112-119.

LANGNER, H.W. et INSKEEP, W.P. (2000). Microbial reduction of arsenate in the presence of ferrihydrite. Environmental Science and Technology, 34, 3131-3136.

LAVERMAN, A. et SWITZER, J. (1995). Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. Applied and Environmental Microbiology, 61, No 10, 3556-3561.

LEIFELD, J., SIEBERT, S. et KOGEL-KNABNER, I. (2001). Stabilization of composted organic matter after application to a humus-free sandy mining soil. Journal Environmental Quality, 30, 602-607.

LIN, H.T., L., WANG, M.C. et LI, G.C. (2002). Effect of water extract of compost on the adsorption of arsenate by two calcareous soils. Water, Air and Soil Pollution, 138, 359-374.

LIN, Z. et PULS, R.W. (2000). Adsorption, desorption and oxidation of arsenic affected by clay minerals and aging process. Environmental Geology, 39, No 7, 753-759.

LUND, U. et FOBIAN, A. (1991). Pollution of two soils by arsenic, chromium, and copper, Denmark. Geoderma, 49, 83-103.

MACUR, R.E, JACKSON, C.R., BOTERO, L.M., MCDERMOTT, T.R. et INSKEEP, W.P. (2004). Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. Environmental Science and Technology, 38, 104-111.

MACUR, R.E., WHEELER, J.T., MCDERMOTT, R. et INSKEEP, W. (2001). Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. Environmental Science and Technology, 35, 3676-3682.

MANNING, B. et GOLDBERG, S. (1996). Modeling arsenate competitive adsorption on kaolinite, montmorillonite and illite. Clays and Clay minerals, 44, No 5, 609-623.

MANNING, B. et GOLDBERG, S. (1997)(a). Arsenic(III) and arsenic (V) adsorption on three California soils. Soil Science, 162, No 12, 886-895.

MANNING, B. et GOLDBERG, S. (1997)(b). Adsorption and stability of arsenic (III) at the clay mineral water interface. Environmental Science and Technology, 31, 2005-2011.

MANNING, B., SCOTT, E.F. et GOLDBERG, S. (1998). Surface structures and stability of arsenic (III) on goethite: Spectroscopic evidence for inner-sphere complexes. Environmental Science and Technology, 32, 2383-2388.

MARTINEZ, C.E., JACOBSON, A.R. et MCBRIDE, M.B. (2003). Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. Environmental Pollution, 122, 135-143.

MARSCHNER, B. et KALBITZ, K. (2003). Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. Geoderma, 113, 211-235.

MASSCHELEYN, P. H., DELAUNE, R. D. et PATRICK, W.H. Jr. (1991). Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. Environmental Science and Technology, 25, 1414 -1419.

MC GEEHAN, S.L. et NAYLOR, D.V. (1994). Sorption and redox transformation of arsenite and arsenate in two flooded soils. Soil. Sc. Soc.Am.J., 58, 337-342.

MCLEAN, J. et BEVERIDGE, T. J. (2001). Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. Applied and Environmental Microbiology, 67, No 3, 1076-1084.

MERCKX, R., BRANS, K. et SMOLDERS, E. (2001). Decomposition of dissolved organic carbon after soil drying and rewetting as an indicator of metal toxicity in soils. Soil Biology and Biochemistry, 33, 235-240.

MOORE, T.J., RIGHTMIRE, C.M. et VEMPATI, R.K. (2000). Ferrous iron treatment of soils contaminated with arsenic containing wood preserving solution. Soil and Sediment Contamination, 9, No 4, 375-405.

N'DAYEGAMIYE, ROYER, A. et AUDESSE, R.P. (1997). Nitrogen mineralisation and availability in manure composts from Quebec biological farms. Canadian Journal of Soil Science, 77, 345-350.

NEFF, J.C. et ASNER, G.P. (2001). Dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: Synthesis and a model, Ecosystems, 4, 29-48.

NEWMAN, D. K., AHMANN, D. et MOREL, F. (1998). A brief review of microbial arsenate respiration. Geomicrobiology, 15, 255-268.

NG, J.C., WANG, J.W. et SHRAIM, A. (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources. Chemosphere, 52, 1353-1359.

NGUYEN, L. (1999). Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. Ecological Engineering, 16, 199-221.

O'NEILL, P. (1995). Arsenic. Heavy metals in soils, John Wiley & Sons, New York. 105-121.

ONKEN, B.M. et ADRIANO, D.C. (1997). Arsenic availability in soil with time under saturated and subsaturated conditions. Soil Sci. Soc. Am. J., 61, 746-752.

ONKEN, B.M. et HOSSNER, L.R. (1995). Plant uptake and determination of arsenic species in soil solution under flooded conditions. Journal of Environmental Quality, 24, 373-381.

ONKEN, B.M. et HOSSNER, L.R. (1996). Determination of arsenic species in soil solution under flooded conditions. Soil Sci. Soc. Am. J., 60, 1385-1392.

OREMLAND, S. et DOWDLE, P. (2000). Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake, California. Geochimica et Cosmochimica Acta, 68, No 18, 3073-3084.

PANTSAR-KALLIO, M. et MANNINEN, P.K.G. (1997). Speciation of mobile arsenic soil samples as a function of pH. The Science of the Total Environment, 204, 193-200.

PASCUAL, J.A., GARCIA, C., HERNANDEZ, T., MORENO, J.L. et ROSS, M. (2000). Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. Soil Biology and Biochemistry, 32, 1877-1883.

PIERCE, M.L. et MOORE, C.B. (1982). Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron oxyhydroxide, Water Research, 16, 1247-1253.

PONGRATZ, R. (1998). Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil. The Science of the Total Environment, 224, 133-140.

PRASAD, D., WAI, M., BÉRUBÉ, P. et HENRY, J.G. (1999). Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage. Environmental Technology, 20, 449-458.

REDDY, K.R., RAO, P.S.C. et JESSUP, R.E. (1981). The effect of carbon mineralization on denitrification kinetics in mineral and organic soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 46, 62-68.

REDMAN, A.D., MACALADY, D.L. et AHMANN, D. (2002). Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. Environmental Science and Technology, 36, 2889-2896.

ROWELL, D.M. et PRESCOTT, C.E. (2001). Decomposition and nitrogen mineralisation from biosolids and other organic materials: relationship with initial chemistry. Journal of Environmental Quality, 30, 1401-1410.

RUOKOLAINEN, M., PANTSAR-KALLIO, M., HAAPA, A. et KAIRESALO, T. (2000). Leaching, runoff and speciation of arsenic in a laboratory mesocosm. The Science of the Total Environment, 258, 139-147.

SAADA, A., BREEZE, D., CROUZET, C., CORNU, S. et BARANGER, P. (2003). Adsorption of arsenic(V) on kaolinite and on kaolinite-humic acid complexes. Role of humic acid nitrogen groups. Chemosphere, 51, 757-763.

SADIQ, M. (1997). Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and field observations. Water, Air, and Soil Pollution, 93, 117-136.

SHEN, Y.H. (1999). Sorption of natural dissolved organic matter on soil. Chemosphere, 38, No.7, 1505-1515.

SMITH, A.H, LOPIPERO, P.A., BATES, M.N. et STEINMAUS, C.M. (2002 b). Arsenic epidemiology and drinking water standards, Science, 296, 2145-2146.

SMITH, E., NAIDU, R. et ALSTON, A.M. (1998). Arsenic in the soil environment. A review. Advanced Agronomy, 64, 149-195.

SMITH, E., NAIDU, R. et ALSTON, A.M. (1999). Chemistry of arsenic in soils: I. Sorption of arsenate and arsenite by four australian soils. Journal of Environmental Quality, 28, 1719-1726.

SMITH, E., NAIDU, R. et ALSTON, A.M. (2002 a). Chemistry of inorganic arsenic in soils: II. Effect of phosphorus, sodium, and calcium on arsenic sorption. Journal of Environmental Quality, 31, 557-563.

STILWELL, D.E. et GORNY, K.D. (1997). Contamination of soil with copper, chromium, and arsenic under decks built from pressure treated wood. Bullettin of Environmental Contamination and Toxicology, 58, 22-29.

SUN, X. et DONER, H.E. (1998). Adsorption and oxidation of arsenite on goethite. Soil Science, 163, No 4, 278-287.

TAMAKI, S. et FRANKENBERGER, W.T. JR. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 124, 79-110.

THANANABALASINGAM, P. et PICKERING, W.F. (1986). Arsenic sorption by humic acids. Environmental Pollution, 12, 233-246.

THURIES, L., PANSU, M.C., FELLER, P., HERRMANN et REMY, J.C. (2001). Kinetics of added organic matter decomposition in a Mediterranean sandy soil. Soil Biology and Biochemistry, 33, 997-1010.

TURPEINEN, R. (2002). Interactions between metals, microbes and plants – Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils. Academic dissertation in environmental ecology, Neapoli, Lahti, Italie.

TURPEINEN, R., PANTSAR-KALLIO, M., HAGGBLOM, M. et KAIRESALO, T. (1999). Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. The Science of the Total Environment, 236, 173-180.

TURPEINEN, R., PANTSAR-KALLIO, M. et KAIRESALO, T. (2002). Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. The Science of the Total Environment, 285, 133-145.

TURPEINEN, R., VIRTÄ, M. et HAGGBLOM, M.M. (2003). Analysis of arsenic bioavailability in contaminated soils. Environmental Toxicology and Chemistry, 22, No.1, 1-6.

URE, A.M. et DAVIDSON, C.M. (2002). In Chemical speciation in the environment. Blackwell Science, Abington, UK, 452p.

WILLIAMS, E.L., BARNETT, M.O., KRAMER, T.A. et MELVILLE, J.O. (2003). Adsorption and transport of arsenic (V) in experimental subsurface systems. Journal of Environmental Quality, 32, 841-850.

WITTBRODT, P.R. et PALMER, C.D. (1995). Reduction of Cr(VI) in the presence of excess soil fulvic acid. Environmental Science and Technology, 29, 255-263.

WITTBRODT, P.R. et PALMER, C.D. (1996). Effect of temperature, ionic strength, background electrolytes, and Fe(III) on the reduction of hexavalent chromium by soil humic substances. Environmental Science and Technology, 30, 2470-2477.

WOLF, D.C., DAO, T.H., SCOTT, H.D. et LAVY, T.L. (1989). Influence of sterilisation methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. Journal of Environmental Quality, 18, 39-44.

WU, L., MA, L.Q. et MARTINEZ, G.A. (2000). Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. Journal of Environmental Quality, 29, 424-429.

XU, H., ALLARD, B. et GRIMVALL, A. (1988). Influence of pH and organic substance on the adsorption of As(V) on geologic materials. Water, Air and Soil Pollution, 40, 293-305.

XU, H., ALLARD, B. et GRIMVALL, A. (1991). Effects of acidification and natural organic materials on the mobility of arsenic in the environment. Water, Air, and Soil Pollution, 57-58, 269-278.



YAN-CHU, H. (1994). Arsenic distribution in soils. In Arsenic in the environment, Part I: Cycling and Characterisation, J.O. Nriagu, ed., Wiley & Sons, New York, 17-41.

YEATES, G.W., ORCHARD, V.A., SPEIR, T.W., HUNT, J.L. et HERMANS, M.C. (1994). Impact of pasture contamination by cooper, chromium, arsenic timber preservative on soil biological activity. Biology and Fertility of Soils, 18, 200-208.

ZAGURY, G.J. et DESCHÊNES, L. (2002). Spéciation et toxicité de l'arsenic dans les sols et dans l'eau souterraine à proximité des poteaux de bois traités au CCA (phase VI), Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites, Département de génie chimique et département CGM, École Polytechnique de Montréal, Rapport final volet 2-Sols pour Bell Canada, Décembre 2002, Projet CDT P2668, 57p.

ZAGURY, G.J., SAMSON, R. et DESCHÊNES, L. (2003). Occurrence of metals in soil and ground water near chromated copper arsenate-treated utility poles. Journal of Environmental Quality, 32, 1-9.


ZHANG, W., CAI, Y., TU, C. et MA, L.Q. (2002). Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. The Science of the Total Environment, 300, 167-177.

ZOBRIST, J. (2000). Mobilisation of arsenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. Environmental Science and Technology, 34, 4747-4753.

## **ANNEXES**

**ANNEXE A : Protocoles expérimentaux. Constitution des sols synthétiques et contamination par du CCA.**

## Protocole P54-A : Constitution des sols synthétiques

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54-A		Nombres de pages : 3	
Version : 1		Date : 2.06.2002	
Auteur(s): <u>Simona Dobran</u> _____ _____			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Gérald Zagury</u> <u>Louise Deschênes</u> _____		Signatures: _____ Date: _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	

Titre : Constitution des sols synthétiques   
Mots clés : sol synthétique   

## 1 OBJECTIF

Ce protocole vise à décrire la composition des sols synthétiques utilisés dans le cadre expérimental du projet.

## 3 MATÉRIELS

- Coupelles de plastique
- Balance analytique (précision 0,01 g)
- Tubes à centrifugeuse en polypropylène (250 ml)
- Limon préparé conformément au protocole 35 –A
- Sable préparé conformément au protocole 35-B
- Kaolinite (EPK, Sial Québec)
- Tourbe sphaigne (Jardinière, Québec)
- Fumier de poulet composté (Fertilo de Fafard, Québec)

Selon la caractérisation de la matière organique (protocoles P54-B, P54-C et P54-D) la source de la matière organique des sols est un mélange tourbe de sphaigne: fumier de poulet composté = 30 : 70 (p/p).

## 3 MÉTHODOLOGIE

En vue de rejoindre les objectifs du projet, le paramètre clé de la composition des sols synthétiques est la matière organique. Suite à la caractérisation chimique de la tourbe et du fumier de poulet (selon les protocoles P54-B, P33-A, P35-D, P54-C et P54-D) la source de matière organique des sols synthétiques est un mélange de tourbe et de fumier de poulet composté (30 %:70 %, p/p). Ainsi, pour déterminer son rôle sur la spéciation de l'arsenic dans les sols, son contenu dans les 4 sols synthétiques va varier de 0,5 % à 15 %. Les autres composants des sols synthétiques sont :

- Limon (25 %)
- Kaolinite (5 %)
- Sable (55 %-69,5 %).

Tableau A1 Composition des sols synthétiques

Composants, (%p/p )	Sol A	Sol B	Sol C	Sol D
Matière organique	0,5	5	7,5	15
Kaolinite	5	5	5	5
Limon	25	25	25	25
Sable	69,5	65	62,5	55

La constitution des sols synthétiques sera réalisée selon la méthodologie du protocole P35 -E. Pour assurer une bonne homogénéité des sols il est conseillé à constituer de faibles quantités de sols, (100-200 g) (Balasoiu, 2001). Les quantités de sols artificiels (A, B, C, D) à préparer sont calculées en fonction de la quantité de sols nécessaire pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques avant et après les essais en macrocosmes (selon le protocole expérimental P54-J).


La méthodologie est décrite ci-dessous :

1. Faire le poids sec des composants selon le protocole A 7 ;
2. Identifier chacun de 12 tubes à centrifugeuse pour chaque sol pour mettre les sols artificiels;
3. Calculer l'humidité des composants purs et déterminer les quantités de composants purs nécessaires pour constituer la quantité désirée de sol en fonction son teneur en eau.
4. Si la teneur en eau est très faible ( $< 0,05\%$ ) elle ne sera pas prise en considération ;
5. Ajouter l'argile la première dans chaque pot ;
6. Ajouter le sable et mélanger vigoureusement pour éviter la formation d'agglomérations d'argile ;
7. Ajouter le fumier de poulet et mélanger vigoureusement.
8. Ajouter la tourbe et mélanger. Attention !!! La tourbe est très fine et elle peut s'élever dans l'air et nuire à l'opérateur ;
9. Ajouter le limon et mélanger vigoureusement ;
10. Agiter le sol pendant 24 heures sur l'agitateur à culbutage à faible vitesse (50 rpm)

#### 4 RÉFÉRENCE(S)

BALASOIU CRISTINA, Protocole expérimental P35-E (2001). Constitution des sols synthétiques. Influence de la composition des sols sur la spéciation et la toxicité du chrome, du cuivre et de l'arsenic dans des sols contaminés par du CCA. Mémoire de maîtrise.

## Protocole 35-A : Récupération du limon à partir d'un sol de base

	<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : <b>35 - A</b>	Nombres de pages : 4	
Version : 1/1	Date : juin 99 – juillet 99	
Auteur(s): <u>Cristina Balasoiu</u> _____ _____		
Approuvé par : <b>Gérald Zagury</b> _____ _____ _____	Signatures : <input checked="" type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	Date : _____ _____ _____

Titre : Récupération du limon à partir d'un sol de base  
Mots clés : limon, sol de base, tamisage, séchage  

## 1 OBJECTIF(S)

Les sols utilisés dans le cadre du projet sont constitués à partir des quatre composants : le sable, l'argile, le limon et la matière organique. Étant donné que le limon pur n'est pas commercialisé, un sol de base (naturel) contenant du limon sera utilisé. Le sol de base provient de la Baie James.

La proportion de limon ajoutée dans les sols synthétiques est constante, soit 25 %.

L'objectif de ce protocole est d'obtenir le limon à partir d'un sol naturel, c'est à dire enlever le sol avec les dimensions des particules plus élevées que 0,075 mm. Il faut tenir compte que la fraction passant 0,075 mm peut contenir aussi de l'argile. Une analyse granulométrique est recommandée.

## 2 MATÉRIELS

- 1 support métallique ou une table grande ;
- 5 bacs en plastique ;
- 1 tamiseur automatique ;
- 7 tamis standards (no. 10, 14, 25, 40, 100, 170, 200) ;
- 3 chaudières en plastique;
- 1 source d'air sous pression ;
- 1 pilon ;
- 1 mortier ;
- 1 spatule en plastique.

## 3 MÉTHODOLOGIE

Le sol de base a été préparé de la manière ci-dessous jusqu'à l'obtention d'environ 8 kg de limon. Les tamis standard permettent d'obtenir un limon avec une granulométrie plus fine que 0,075 mm.

- Poser le sol dans des bacs en plastique (en couche mince pour une meilleure aération) ;
- Mélanger périodiquement à l'aide d'une spatule ou avec la main ;
- Laisser le sol à sécher pendant une semaine (ou moins, selon la quantité de sol à sécher) ;
- Déterminer la teneur en eau conformément au protocole A7 ;
- Tamiser le sol sec sur le tamiseur automatique et garder la fraction passant 0,075 mm (tamis no.200) . Le tamiseur contient 7 tamis (no. 10,14, 25, 40, 100, 170 et 200) ;
- Broyer les particules retenues dans le tamis passant 2 mm ;
- Tamiser les particules broyées ;

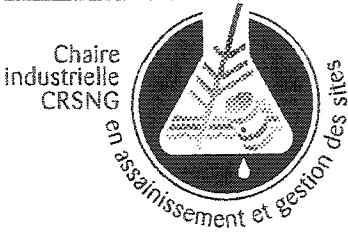
- Nettoyer de temps en temps (laver à l'eau et sécher à l'air sous pression) les tamis les plus fins pour éviter l'obturation ;
- Faire l'analyse granulométrique de la fraction retenue (passant 0,0075 mm).

#### **4 RECOMMANDATIONS**

S'il faut tenir compte de la concentration des métaux présents dans le sol, il vaut mieux éviter les outils métalliques.



## Protocole A7 : Détermination du poids sec d'un sol

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : A7		Nombres de pages : 5	
Version : 2		Date : 05-04-00	
Auteur(s): Sandra Estrela <hr/> <hr/>			
Approuvé par : Manon Leduc <hr/> <hr/>		Signatures: _____ Date: _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	

- Titre : Détermination du poids sec d'un sol

Mots clés : poids sec, pourcentage ou taux d'humidité, pourcentage ou taux d'eau, sol, caractérisation physique

## 1 DOMAINE D'APPLICATION

Ce protocole s'applique aux sols organiques et inorganiques, roches et matériaux similaires.

## 2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le poids sec (aussi nommé % d'eau ou d'humidité) est déterminé par séchage à 105 (sols organiques et tourbe) ou 110°C (autres sols et roches), jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon. Le contenu en eau de l'échantillon à l'étude est alors considéré comme étant le ratio, exprimé en pourcentage, de la masse d'eau « libre » ou « contenue dans les pores » sur la masse d'échantillon original.

## 3 MATÉRIEL

- Four réglable à une température constante et uniforme de 105 et  $110 \pm 5$  ° C;
- Balance analytique de précision de 0.0001 g;
- Coupelles d'aluminium;
- Dessicateur;
- Dessicant (drierite = sulfate de calcium anhydre);
- Gants ou pinces propres (pour manipuler les coupelles);
- Matériel de prélèvement des échantillons (spatule, cuillère ou couteau selon les besoins).

## 4 MODE OPÉRATOIRE

Il est fortement recommandé d'effectuer au moins des duplicatas lors de l'analyse du taux d'humidité de chacun des échantillons.

1. La pesée d'échantillon doit se faire dans une coupelle préalablement séchée. Pour ce faire, 2 options sont possibles : 1) Déposer les coupelles vides préalablement identifiées (initiales, date et numéro d'échantillon) dans le dessicateur suffisamment longtemps (la nuit) afin de les sécher ou 2) Déposer les coupelles préalablement identifiées au four à 105°C (apporter le dessicateur près des balances pour éviter d'humidifier les coupelles). Dans ce cas, la coupelle doit être ramenée à la température de la pièce avant la pesée de l'échantillon (1 heure dans le dessicateur);
2. Calibrer la balance selon le PSO E2;
3. Déposer la coupelle sèche sur la balance et noter le poids (PC);
4. Bien homogénéiser l'échantillon de sol à l'étude;
5. Sans remettre la balance à 0, ajouter environ 5 g de l'échantillon humide à l'étude dans la coupelle en prenant soin de prendre un échantillon représentatif (voir section NOTES pour les recommandations concernant les prélèvements) et noter le poids (PH);
6. Mettre au four la coupelle contenant l'échantillon humide et sécher au four à 105°C (sol organique ou tourbe) ou 110 °C (autre type de sol ou roches) pendant environ 16 h

(minimum) ou jusqu'à ce que la masse soit constante (attendre au moins 1 h entre chaque pesée);

7. Refroidir au dessiccateur à température ambiante, en s'assurant de ne pas réhumidifier l'échantillon (apporter le dessiccateur près du four);

8. Calibrer à nouveau la balance selon le PSOE2;

9. Peser la coupelle contenant l'échantillon maintenant sec (apporter de nouveau le dessiccateur près des balances) et noter le poids (PS);

10. Disposer des échantillons.

## 5 CALCULS

Le taux d'humidité de l'échantillon est calculé selon l'une des deux équations suivantes :

$$\% \text{ d'eau} = \frac{(\text{PH}-\text{PC})-(\text{PS}-\text{PC}) \times 100}{(\text{PH}-\text{PC})} \quad (\text{équation 1.0})$$

ou

$$\% \text{ d'eau} = \frac{(\text{PH}-\text{PC})-(\text{PS}-\text{PC}) \times 100}{(\text{PS}-\text{PC})} \quad (\text{équation 2.0})$$

où PC: poids coupelle sèche (g)

PH: poids coupelle + échantillon humide (g)

PS: poids coupelle + échantillon sec (g)

L'équation 1.0 est couramment utilisée en environnement. Elle indique le % d'humidité de l'échantillon en fonction du poids humide alors que la seconde indique le % d'humidité de l'échantillon en fonction du poids sec de ce dernier (plus utilisée dans le domaine géotechnique). Il faut toujours indiquer clairement si vous utilisez le % par rapport au poids sec ou au poids humide.

Pour un même utilisateur, les duplicatas d'échantillon ne devraient pas différer de plus de 7.8% de la moyenne des échantillons.

## 6 LIMITE(S) DE LA MÉTHODE

Cette méthode s'applique aux échantillons de moins de 200 g.

## 7 RÉFÉRENCE(S)

ASTM D2216-92, ASTM D2974-87

## 8 NOTE(S)

1 Prélèvement d'un échantillon représentatif.

- Pour favoriser l'homogénéisation de l'échantillon, bien mélanger ce dernier avant le prélèvement et prélever environ 5 portions réparties en différents endroits de l'échantillon;
- Éviter de prélever des portions en contact avec les parois du contenant où se trouve l'échantillon car ces portions risquent d'être plus humides étant donné la condensation sur les parois;

## **2 Pesée de l'échantillon**

- Les balances analytiques sont très sensibles aux courants de convection générés par la chaleur. Toujours vous assurer que l'échantillon à peser est à température de la pièce;
- Dans les méthodes ASTM, on recommande de prendre un minimum de 20 g d'échantillon toutefois, ceci peut être compensé par l'utilisation de duplicatas et triplicatas. Toujours prendre en note la quantité d'échantillon pesée;
- Pour un échantillon de roches, une quantité d'au moins 500 g est recommandée par l'ASTM;


## **3 Séchage de l'échantillon au four**

- Attention lors du séchage de sol contaminé au four. Assurez-vous qu'il n'y a pas de dégagement gazeux néfaste pour la santé;
- La température de 105°C est très importante en ce qui a trait aux sols organiques. En effet, une température plus élevée pourrait entraîner une décomposition de l'échantillon. Si le contenu en matière organique de votre échantillon n'est pas connu, effectuer le séchage à 105 °C;
- Les matériaux contenant du gypse (sulfate de calcium dihydraté) ou un très haut taux de matière organique peuvent être problématiques lors de la détermination du taux d'humidité. En effet, ces matériaux ont tendance à se dessécher au four ou à des % d'humidité très faibles telles que les conditions d'un dessiccateur. Pour ce genre de matériau, il serait préférable de sécher préalablement l'échantillon à 60°C avant la pesée (ne pas oublier de ramener l'échantillon à température de la pièce). Prendre en note toute modification à la méthode standard dans ce cas;
- Si après une nuit au four l'échantillon semble toujours humide, prolonger la période de chauffage;

## **4 Utilisation du dessiccateur**

- Deux dessiccateurs sont à votre disponibilité. Lorsque vous devez déplacer le dessiccateur (lorsque vous allez chercher vos échantillons au four, par exemple), veuillez utiliser le dessiccateur noté MOBILE;
- Il est possible de laisser refroidir les échantillons secs sur le comptoir si on utilise des couvercles étanches;
- Toujours s'assurer que le dessiccant est sec avant d'utiliser le dessiccateur, en cas de doute, faire sécher au four le dessiccant sur un plateau.

## Protocole 35-G : Augmentation du pH d'un sol synthétique

<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>Chaire industrielle CRSNG</p>  <p>en assainissement et gestion des sites</p> </div> <div style="margin-left: 20px;"> <p><b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b></p> </div> </div>	
Protocole # : <b>35 - G</b>	Nombres de pages : 4
Version : 1/2	Date : octobre 99- novembre 99
Auteur(s): <u>Cristina Balasoiu</u>	
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>Approuvé par :</p> <p><b>Gérald Zagury</b></p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>Signatures : _____ Date : _____</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> _____</p> <p><input type="checkbox"/> _____</p> <p><input type="checkbox"/> _____</p> </div> </div>	

<p><b>Titre :</b> Augmentation du pH d'un sol synthétique</p>   
<p><b>Mots clés :</b> sol acide, pH, carbonate de calcium, dissolution</p>   

## 1 OBJECTIF(S)

Dans le cadre du projet on utilise neuf types de sols synthétiques. Après avoir fait la caractérisation des sols on a constaté qu'il y a 6 des 9 sols qui ont un pH plus faible que la valeur minimale imposée, soit 5,5.

Ce pH a été choisi car les plantes et les vers de terre ne peuvent pas survivre dans des sols trop acides. Les plantes peuvent survivre dans des sols avec des pH entre 5 – 7,5, alors que pour les vers de terre les valeurs acceptées sont entre 5,5 – 6,5 (CEAEQ, Christian Bastien).

Les sols qui font l'objet de ce protocole sont les sols D, E, F, G, H et I (voir le protocole 35 - F)

L'objectif de ce protocole est d'augmenter le pH d'un sol synthétique qui est faiblement acide en ajoutant du carbonate de calcium.

Chaque essai sera fait en duplicata.

## 2 MATÉRIEL

- 50 g de chacun des sols ci-dessus mentionnés ;
- 50 g de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) (*Anachemia*, AC – 1940) ;
- 58 bouteilles à centrifugeuse (50 ml) ;
- matériel nécessaire pour déterminer le pH d'un sol (voir le protocole 35 – F) ;
- 18 pots en verre avec couvercle (250 ml) ;
- 1 agitateur rotatif ;
- 1 spatule en plastique ;
- 1 balance analytique ;

## 3 MÉTHODOLOGIE

Les sols synthétiques D, E, F, G, H et I ont un pH au-dessous de la valeur minimale acceptée, soit 5,5. Comme tous ces sols ont à peu près le même pH on va utiliser la même technique pour augmenter le pH. Du  $\text{CaCO}_3$  solide sera ajouté aux sols synthétiques (EPA, 1988, Spurgeon, 1994, Neuhauser, 1985, Marinussen, 1997).

Parce que la quantité requise de carbonate de calcium pour augmenter le pH des sols n'est pas connue, plusieurs essais sont faits avec des proportions différentes. Les proportions de carbonate de calcium (poids/poids) à essayer sont : 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5% et 2%.

Pour avoir les mêmes réponses dans les mêmes conditions, le pH des neuf sols est déterminé selon le protocole 35-F.

Pour la simplicité toutes les étapes sont décrites pour un seul type de sol, ainsi pour tous les autres on suit la même procédure.

Les étapes sont les suivantes :

- Mettre 50 g de sol dans les pots ; Noter le type du sol et la proportion du  $\text{CaCO}_3$  ajoutée ;
- Ajouter les quantités nécessaires de carbonate de calcium selon le tableau 1. ;
- Placer les pots sur l'agitateur rotatif ;
- Laisser agiter les pots pendant 24 heures (à environ 35 rpm) ;
- Peser 10 g de (sol +  $\text{CaCO}_3$ ) dans une bouteille à centrifugeuse ;
- Ajouter 40 ml d'eau distillée ;
- Laisser équilibrer pour 24 heures ;
- Lire le pH.

**Tableau 1. Quantité de carbonate de calcium à ajouter**

Type de sol	Carbonate de calcium (g)				
<b>Sol D</b>	0,25	0,375	0,5		
<b>Sol E</b>		0,375	0,5	0,75	
<b>Sol F</b>		0,375	0,5	0,75	
<b>Sol G</b>		0,375	0,5	0,75	
<b>Sol H</b>		0,375	0,5	0,75	
<b>Sol I</b>			0,5	0,75	1

#### 4 RÉFÉRENCES

**CEAEQ**, Christian Bastien, discussion personnelle ;


**EPA/600/3-88/029**, July 1988. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste site, Vers de terre, essais de toxicité aiguë ;

**MARINUSSEN, M.P.J.C., VAN DER ZEE, S.E.A.T.M., DE HAAN, F.A.M.**, 1997. Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions, Ecotoxicology and Environmental safety, **36**, 17 – 26 ;

**NEUHAUSER, E.F.**, 1985. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia foetida*, Biology and Fertility of Soils, **1**, 149 – 152 ;

**SPURGEON, D.J.**, 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) : Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems, Environmental Pollution, **84**, 123-130.

**Protocole P35-H: Contamination artificielle d'un sol synthétique avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté (CCA).**

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P35-H		Nombres de pages :8	
Version :1/2		Date : nov. 1999-dec.1999	
Auteur(s): <u>Cristina Balasoïu</u> _____ _____			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Gérald Zagury</u> _____ _____		Signatures: _____ Date: _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	

- Titre : Contamination artificielle d'un sol synthétique avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté (CCA).

Mots clés : CCA, sol synthétique, contamination artificielle



## 1 OBJECTIF (S)

Les 9 sols synthétiques utilisés dans le cadre du projet sont contaminés artificiellement avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté de concentration connue. Les sols ainsi contaminés seront soumis à des tests de toxicité avec des plantes et avec des vers de terre *Eisenia foetida*. Pour faciliter les travaux, seul le centroïde, le sol no. 9, est utilisé pour déterminer la CL50. La concentration de CCA à tester est choisie en fonction de la revue de la littérature et des résultats obtenus dans le cadre du projet Bell 5. Plusieurs études ont été faites sur la toxicité de métaux (As, Cr et Cu). La CL50 de l'As(V) est 100 ppm (Fisher, 1992), la CL50 du Cr(VI) est 15 ppm (Abassi, 1983) et la CL50 du Cu(II) est 683 ppm (Spurgeon, 1995). Dans le cadre du projet Bell 5, les concentrations des métaux présents dans le sol varient entre 300 et 1500 ppm, selon le nombre d'années de service des poteaux et le type de sol.

Une seule étude (Yeates, 1994) existe sur la toxicité des trois métaux du CCA présents dans le sol et il est démontré que 800 ppm d'arsenic, de chrome et de cuivre inhibent toutes les activités biologiques du sol. Afin de faciliter les interprétations des résultats, il est plus indiqué de discuter de concentrations de métaux (arsenic, chrome et cuivre) présents dans le sol, que de concentration de CCA.

Le sol 9 a un pH au-dessous de la valeur établie. Avant de contaminer le sol son pH est ajusté à 5,5 avec du carbonate de calcium solide, conformément au protocole expérimental 35 – G 2. Ainsi, le sol est contaminé avec une solution aqueuse de CCA très concentrée et il est ensuite envoyé aux laboratoires CEAEQ pour les tests écotoxicologiques. Là, ils vont diluer le sol contaminé avec le même sol no.9 non contaminé et ils vont déterminer la CL50 de la solution de CCA pour les deux tests. Après l'obtention de la CL50, les 9 sols seront contaminés avec cette concentration.

Les concentrations de métaux présents dans les 2214 ppm de CCA sont : 800 ppm As, 884 ppm Cr et 539 ppm Cu (le calcul est montré à la section no.5).

L'objectif principal de ce protocole est de déterminer une méthode de contamination afin d'assurer un contact plus étroit entre les particules du sol et le contaminant.

## 3 MATÉRIEL

- matériel nécessaire pour déterminer la teneur en eau selon le protocole A 7 ;
- matériel nécessaire pour l'ajustement du pH selon le protocole 35 – G 2 ;
- matériel nécessaire pour la digestion totale selon le protocole 32 – D ;
- 1 centrifugeuse ;
- 1 balance analytique (précision 0,01) ;
- 1 bouteille en polycarbonate (500 ml) résistante à une vitesse de centrifugation de 11 000 x G ;
- bêchers (40 ml, 100, 500 ml) ;
- 1 pipette de 0,5 ml ;
- 2 ballons jaugés (100 mL) ;
- 1 pipette Pasteur ;

- 1 agitateur rotatif (55 rpm) ;
- filtres (0,45  $\mu\text{m}$ ) en polycarbonates ;
- seringues en plastique (30 mL) ;
- 1 plat en pyrex ;

## 4 MÉTHODOLOGIE

Il est connu que l'adsorption des contaminants a lieu en deux temps : une phase initiale rapide est réversible, suivie par une période lente. La séparation entre les deux phases est arbitraire, mais dans plusieurs cas, elle a lieu quelques heures ou quelques jours après la contamination. Afin d'avoir une évaluation correcte et réaliste des résultats des tests auxquels les sols contaminés sont soumis (l'extraction séquentielle sélective et les tests de toxicité), on essaye d'assurer un contact parfait entre les particules du sol et les molécules du contaminant. De plus, pour augmenter l'adsorption du contaminant sur le sol, on accorde une période de vieillissement plus grande à la contamination, soit 6 jours de contact.

### 3.1 Prétraitement

1. Ajuster le pH du sol à 5,5 (si nécessaire) conformément au protocole expérimental 35 – G 2 ;
2. Déterminer le poids sec du sol conformément au protocole expérimental A 7 ;
3. Peser l'équivalent à 100 g de sol à la balance analytique et noter le poids ;
4. Mettre le sol dans une bouteille en polycarbonate ;
5. Parallèlement, si le pH de l'eau distillée n'est pas près de la neutralité, faire buller de l'air pendant 30 minutes ;
6. Ajouter 100 mL d'eau distillée dans un ballon jaugé, afin d'avoir un taux sol : solution = 1 : 1. L'humidification du sol permet aux particules de sol de reprendre les propriétés physiques qu'ils avaient avant le séchage (Hassan, 1996) ;
7. Ajouter l'eau et mélanger doucement avec le sol sans toucher le bouchon de la bouteille ;

### 3.2 Équilibre

Entreposer le sol humide pour 24 heures (Hassan, 1996).

### 3.3 Contamination du sol

1. Ajouter 50 ml d'eau distillée dans ballon jaugé de 100 mL ;
2. Ajouter 0,378 mL CCA 55 % dans le ballon jaugé (le calcul est montré à la section no.5) ;
3. Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au volume de 100 mL et mélanger la solution de CCA ;
4. Ajouter la solution de CCA dans la solution de sol obtenue au point 8 ;
5. Ajouter dans le même ballon jaugé 100 mL d'eau distillée et agiter ;

6. Ajouter le contenu du ballon jaugé dans la bouteille contenant de la solution de sol afin d'obtenir un taux final sol : solution = 1 : 3 ;
7. Mesurer le pH de la suspension du sol ;
8. Mettre deux couches de parafilm sur la bouteille et bien fermer le bouchon ;
9. Mettre une autre couche de parafilm au-dessus du bouchon ;
10. Agiter vigoureusement la bouteille contenant le sol et le contaminant ;

#### **Période de contact avec agitation**

Poser la bouteille sur un agitateur rotatif (environ 55 rpm) et laisser agiter à la température de la pièce ( $21 \pm 2$  °C) pendant 24 heures. Plusieurs chercheurs (Carey, 1996 ; Darland, 1997 ; Davis, 1995) font des études d'adsorption des métaux en utilisant une période de 24 heures d'agitation. Cette période a été trouvée suffisante par Carey (1996) pour permettre aux trois métaux (l'arsenic, le chrome et le cuivre) d'atteindre l'équilibre d'adsorption. L'adsorption est influencée par le type d'agitation, ainsi un contact complet entre particules de sol et le contaminant est assuré par une agitation plus vigoureuse (Carbonell Barrachina, 1996) ;

Tzou (1998) a montré que l'adsorption d'une forte concentration de chromate (100 mg/L) atteint l'équilibre seulement après 5 jours d'agitation. L'équilibre est atteint en 3 jours pour des concentrations plus faibles (5 – 40 mg/L).

#### **Période de contact sans agitation (test préliminaire)**

1. Enlever la bouteille de l'agitateur et la laisser à la température de la pièce au repos pendant 5 jours (120 heures). Plusieurs chercheurs ne laissent pas une période de repos, seul Tongbin (1994) après une agitation de 4 heures laisse le sol contaminé se reposer pendant 24 heures. Aide (1992) a laissé équilibrer sans agitation différentes concentrations de chromate (0,1 - 8 mg/L) pendant plus de 10 jours.
2. Prendre 10 ml suspension de sol après 6, 24 et 48 heures de repos afin de déterminer le taux d'adsorption des métaux en fonction de temps ;
3. Filtrer la suspension (0,45 µm) et faire analyser pour l'arsenic, le chrome et le cuivre ;

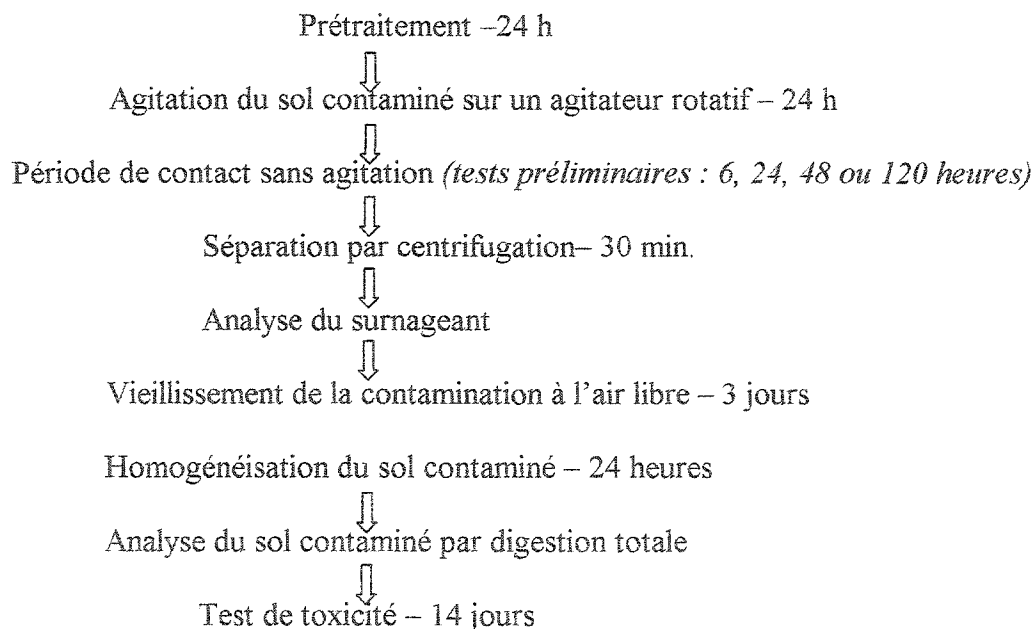
### **3.4 Vieillessement de la contamination**

L'analyse du cuivre du chrome et de l'arsenic (les résultats sont montrés à la fin de ce protocole) présents dans la solution de sol obtenue au point 20 a démontré que la concentration des métaux diminue avec le temps. Donc, une période plus longue de contact sans agitation sera allouée, soit 120 heures.

1. Après la période de contact sans agitation centrifuger le sol à 10 000 rpm (4 000 x g) pour 30 minutes. Cette vitesse permet d'éviter les pertes des particules colloïdales (Zachara, 1989 ; Hassan, 1996)
2. Prélever le surnageant avec attention à l'aide d'une pipette ;
3. Filtrer le surnageant (filtre de 0,45 µm) à l'aide d'une seringue de 30 mL ;

4. Faire analyser le surnageant. Noter la concentration de métaux (As, Cr, et Cu) qui se trouvent dans la solution ;
5. Transférer le culot dans un plat en pyrex en couche très fin et entreposer le à la température de la pièce ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'au moment qu'il soit sec (environ 3 jours) ;
6. Déterminer la concentration de métaux présents dans le sol par digestion totale selon le protocole expérimental 32 D ;
7. Déterminer le poids sec du sol contaminé. Il est fortement possible que le sol soit sec ;
8. Mesurer le pH du sol contaminé ;
9. Ajuster le pH du sol s'il est au-dessous de 5,5 avec du carbonate de calcium selon le protocole 35 – G 2 ;
10. Transférer le sol sec contaminé à l'aide d'une spatule en teflon dans une bouteille en polycarbonate ;
11. Poser la bouteille sur l'agitateur rotatif (environ 55 rpm) et laisser agiter à la température de la pièce ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) pendant 24 heures pour permettre l'homogénéisation des particules de sol ;
12. Placer le sol sec contaminé dans un contenant (selon les spécifications du CEAEQ) et envoyer au CEAEQ pour les analyses écotoxicologiques.

### **3.6. Schéma d'opération**



#### 4 RÉFÉRENCE(S)

- ASTM D 1625(1997). Standard Specification for Chromated Copper Arsenate
- CAREY, P.L., MCLAREN, R.G., ADAMS, J.A.(1996). Sorption of cupric, dichromate and arsenate ions in some New Zealand soils, Water, Air and Soil Pollution, **87**, 189 – 203 ;
- CEAEQ, Christian Bastien, E-mail, 26 novembre 1999 ;
- CARBONELL BARRACHINA, A.A., BURLO CARBONELL, F.M., MATAIX BENEYTO, J.J.(1996) Arsenite adsorption and desorption by calcareous soil. II. Equilibrium data : Isoterms, Agrochimica, **XL – N.2-3**, 79 – 84 ;
- DARLAND, J.E., INSKEEP, W.P.(1997). Effects of pH and phosphate competition on the transport of arsenate, Journal of Environmental Quality, **26**, 1133 – 1139 ;
- DAVIS, A., OLSEN, R.(1995). The geochemistry of chromium migration and remediation in the subsurface, Ground Water, **33 (5)**, 759 – 768 ;
- HASSAN, S.M., GARRISON, A.W.(1996). Distribution of chromium species between soil and porewater, Chemical Speciation and Bioavailability, **8 (3/4)**, 85 – 103 ;
- TONGBIN, C.(1994). Arsenate adsorption in soil and its mechanism, China Environmental Science, **5(1)**, 85 – 91 ;
- TZOU, Y.M., CHEN, Y.R., WANG, M.K. (1998). Chromate sorption by acidic and alkaline soils, Journal of Environmental Science and Health, **A33 (8)**, 1607 - 1630 ;
- ZACHARA, J.M., AINSWORTH, C.C., COWAN, C.E., RESCH, C.T.(1989), Adsorption of chromate by subsurface soil horizons, Soil Science Society of America Journal, **53**, 418 – 427 ;
- YEATES, G.W., ORCHARD, V.A., SPEIR, T.W., HUNT, J.L., HERMANS, M.C.C. (1994) Impact of pasture contamination by copper, chromium, arsenic timber preservative on soil biological activity, Biology and Fertility of Soils, **18**, 200 – 208 ;
- YONG, R.N., PHADUNGCHWIT, Y.(1993). pH influence on selectivity and retention of heavy metals in some clay soils, Canadian Geotechnical Journal, **30**, 821 – 833 ;

#### Calcul de la quantité nécessaire de solution de CCA 55 % à ajouter dans le sol

Selon ASTM D 1625 la composition du CCA pur (poids/poids) est :

34 %  $\text{As}_2\text{O}_5$   
 47,25 %  $\text{CrO}_3$   
 19 %  $\text{CuO}$

Dans la solution de CCA 55 % (poids/poids)

Densité du CCA 55 % = 1733 g/L

55 g CCA pur ..... 100 g solution de CCA

Le volume occupé est :  $v = m/\rho = 100 / 1733 = 0,0577 \text{ L} = 57,7 \text{ mL}$  solution de CCA

Dans 55 g CCA pur il y a

$55 * 0,34 = 18,7 \text{ g As}_2\text{O}_5$

$$55 * 0,4725 = 26 \text{ g CrO}_3$$

$$55 * 0,19 = 10,3 \text{ g CuO}$$

Dans le sol (1000 g)

Concentration d'arsenic dans le sol = 800 ppm

800 ppm As = 800 mg As/kg sol sec

Masse moléculaire de  $\text{As}_2\text{O}_5$  = 230

Masse moléculaire de  $\text{CrO}_3$  = 100

Masse moléculaire de  $\text{CuO}$  = 79,54

La quantité de  $\text{As}_2\text{O}_5$  qui contient 0,8 g As est  $(0,8 * 230) / 150 = 1,2266 \text{ g}$

Le volume de CCA 55 % à ajouter dans les 1000 g de sol est :  $(57,7 * 1,2266) / 18,7 = 3,78 \text{ mL}$

La concentration des autres composés (chrome et cuivre) :

Dans 3,78 mL on a :

$$(3,78 * 26) / 57,7 = 1,70 \text{ g CrO}_3$$

$$(3,78 * 10,3) / 57,7 = 0,67 \text{ g CuO}$$

La concentration de chrome qui se trouve dans 1,7 g  $\text{CrO}_3$  est  $(1,7 * 52) / 100 = 0,884 \text{ g} = 884 \text{ ppm}$

La concentration de cuivre qui se trouvent dans 0,67 g  $\text{CuO}$  est  $(63,5 * 0,67) / 79,5 = 0,53 \text{ g} = 530 \text{ ppm}$

Donc, dans le sol il y a 2214 ppm CCA pur.

Dans le sol (100 g) Le volume de solution de CCA 55 % à ajouter dans le sol est dix fois plus faible, soit 0,378 mL.

## **ANNEXE B : Protocoles expérimentaux. Caractérisation de la matière organique.**

**Protocole P54-B : Détermination de paramètres chimiques de la tourbe et du fumier de poulet, source de matière organique dans la constitution des sols synthétiques.**

<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54- B	Nombres de pages : 6
Version : 1	Date : 30.03.2002
Auteur(s): <u>Simona Dobran</u> _____	
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u>  Gérald Zagury	Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ 3.04 2002 <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Titre : Détermination de paramètres chimiques de la tourbe et du fumier de poulet, source de matière organique dans la constitution des sols synthétiques</li> </ul>
Mots clé : composition de la matière organique, biodégradation de la matière organique, degré d'humification



## 1 OBJECTIF

L'objectif de ce protocole est de caractériser la tourbe de sphaigne (Jardinière) et le fumier de poulet composté (Fertilo de Fafard) en vue de leur utilisation comme source de matière organique dans la constitution des sols synthétiques contaminés avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté (CCA). Le choix de la matière organique de sols synthétiques sera fait après une caractérisation chimique des deux matériaux organiques, tels que la tourbe et le fumier de volaille. Ainsi, la détermination des paramètres chimiques donnera un aperçu sur le contenu des principales substances nutritives y présentes et sur le degré d'humification des matériaux organiques.

## 2 MÉTHODOLOGIE

La caractérisation chimique de ces deux sources de carbone consiste dans l'analyse des paramètres présentés : azote total Kjeldahl (NTK), carbone organique total (COT), P total, azote ammoniacal, le ratio C/N, le contenu en matière organique (%volatils solides à 550 °C). De plus, des paramètres qui reflètent le degré d'humification ont été déterminés suite à l'extraction alcaline, soit le pourcentage d'acides humiques (HP) et le ratio d'humification (HR).

La signification des paramètres chimiques utilisés dans la caractérisation d'un matériel organique est la suivante :

- le rapport C/N est calculé comme le rapport COT/ TKN. En général, il est considéré que pour un matériel organique, un C/N= 6-10 représente un matériel facilement décomposable, C/N supérieur à 10 signifie un contenu excessif de carbone et un rapport C/N inférieure à 6 signifie un manque de carbone (Prasad *et al.*, 1999 ; Thuries *et al.*, 2001)
- le pourcentage d'acides humiques (HP) est calculé comme  $100 \cdot \text{AH} / \text{SH}$  (AH représente les acides humiques et SH les substances humiques)
- le ratio d'humification (HR) est calculée comme le rapport entre AH/FF (FF représente les fractions fulviques = acides fulviques (AF)+substances non-humiques). En général, le HP et HR augmentent avec la stabilisation du matériel organique (le contenu en AH augmente et en AF diminue). Les acides humiques deviennent la fraction des substances humiques la plus importante dans un matériel organique composté et stable (Chafetz *et al.*, 1996 ; Hsu et Lo , 2001)

### 3 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Chambre froide à 4°C;
- Balance de 0,01 de précision
- Tamis no. 14 et no.18
- Agitateur a culbutage,60 rpm
- PH-mètre
- Bouteilles à centrifugeuse (6) (250 ml)
- Centrifugeuse de marque BECKMAN, J2-21
- Rotor de centrifugeuse marque JA-10
- Cylindres gradués ( 2 x50 ml, 2 x250 ml)
- Bouteilles de 500 ml avec bouchon vissable pour les solutions préparées ( NaOH 0.5 M, HCl 6 M, HCl 0.5 M )
- Bonbonne d'azote
- Étuve
- Dessiccateur
- Hotte chimique
- Eau déionisée
- Parafilm

### 4 PROCÉDURE

4.1 Préparer les échantillons de fumier et de tourbe en vue de la caractérisation chimique.

- 1.Passer environ 1 kg de la tourbe et du fumier sur les tamiseurs (tamis no.14 et no.18 en dessous) pour enlever la fraction passant 1 mm .
- 2.Briser les agglomérats avec une spatule en plastique, tamiser encore une fois et récupérer la fraction restante.
- 3.Garder la tourbe et le fumier à 4 ° C.

**Recommandations :** Pendant le tamisage, il est conseillé de porter un masque anti-poussière et de travailler sous la hotte chimique.

4.2 Déterminer le contenu en COT, NTK, N ammoniacal ( N-NH<sub>4</sub>), P total. À cette fin expédier les échantillons de fumier et de tourbe (en duplicata) chez Philips Services Analytiques.

4.3. Déterminer le contenu en matière organique. Déterminer le contenu de la matière organique, soit le % des solides volatils à 550 ° C de la tourbe et fumier de poulet, selon le protocole 33-A.

**Recommandations :** Etant donné que le contenu de matières organiques dans les échantillons est élevé, il est préférable de ne pas enflammer les échantillons dans le four pour prévenir la perte de la matière organique par volatilisation. Ainsi, les échantillons seront introduits dans le four froid et la température sera augmentée progressivement.

#### 4.4. Déterminer les paramètres d'humification suite à l'extraction alcaline

L'extraction alcaline pour les deux sources de carbone sera réalisée selon le protocole 35-D, mais par deux extractions successives avec le NaOH 0,5 M (Chefetz *et al.*, 1996 ; Nguyen, 2000) :

1. Exécuter les étapes 3.3.1 à 3.3.2 sous-étape 5.
2. Après la sous-étape 5 garder le filtrat dans une autre bouteille et procéder à une nouvelle extraction sur le précipité restant selon l'étape 3.3.2 sous-étapes 1-5.
3. Après la deuxième extraction traiter le précipité restant de substances non humiques conformément à l'étape 3.3.2 sous-étapes 7-13.
4. Mélanger les deux filtrats et procéder à l'étape de séparation 3.4.
5. Procéder à l'étape 3.4 jusqu'au sous-étape 4.
6. Laisser reposer l'extrait pendant 24 h pour une bonne séparation des acides humiques de fraction fulviques.
7. Procéder aux sous-étapes 5,6 et 7 de l'étape 3.4.

**Recommandations :** Dans le cadre de l'étape de l'extraction alcaline avec NaOH 0,5 M, il est recommandable pour une meilleure efficacité du barbotage de l'azote dans les bouteilles de centrifugeuses, d'introduire l'aiguille pour le barbotage dans un couvercle de centrifugeuse percé et recouvert avec parafilm pour empêcher que l'air entre dans la bouteille. En ce qui concerne le temps de barbotage, il sera préférable un temps de barbotage d'environ 30 min.

#### Calculs

- Calcul du % de débris, % de substances humiques (SH) (correspondent à A'' du protocole 35-D), % d'acides humiques (AH), % de fractions fulviques (FF) (qui correspondent au terme des acides fulviques du protocole 35-D) seront calculés selon le protocole 35 -D.
- Calcul du pourcentage d'acides humiques (HP) et du ratio d'humification (HR)

$$HP = 100 \times AH / SH$$

$$HR = HA / FF$$

## 5 RÉFÉRENCE(S)

CHEFETZ, B., HATCHER, P., HADAR, Y. et CHEN, Y. (1996). Chemical and Biological Characterization of organic matter during composting of municipal solid waste. Journal of Environmental Quality, 25, 776-785.

DOU, Z., GALLIGAN, R.D. et ALLSHOUSE (2001). Manure sampling for nutrient analysis: variability and sampling efficacy. Journal of Environmental Quality, 30, 1432-1437.

HSU, J.H et LO, S. (2001). Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese and zinc from swine manure. Environmental Pollution, 114, 119-127.

NGUYEN, L. (1999). Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel –bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters, Ecological Engineering, 16, 199-221.


PRASAD, D., WAL, M., BERUDE, P. et HENRY, J.C. (1999). Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage. Environmental Technology, 20, 449-458.

ROWELL, D.M. et PRESCOTT, C.E. (2001). Decomposition and nitrogen mineralisation from biosolids and other organic materials: relationship with initial chemistry. Journal of Environmental Quality, 30, 1401-1410.

THURIES, L., PANSU, M.C., FELLER, P., HERRMANN, P. et REMY, J.C. (2001) Kinetics of added organic matter decomposition in a Mediterranean sandy soil . Soil Biology and Biochemistry, 33, 997-1010.

WU, L., MA, L.Q. et MARTINEZ, G.A. (2000). Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. Journal of Environmental Quality, 29, 424-429.

**Protocole P33-A : Détermination de la matière organique dans un résidu minier par combustion à 550 °C.**

 <p style="text-align: right;"><b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b></p>	
Protocole # : P33-A	Nombres de pages : 02
Version : 1	Date : 01/12/98-25/12/98
Auteur(s): <u>Kahina Oudjehani</u> _____	
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Gérald Zagury</u> <u>Pierre Gagnier</u> _____	Signatures: _____ Date: _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____

- Titre : Détermination de la matière organique dans un résidu minier par combustion à 550 °C.

Mots clés : Matière organique, cendres, résidu.

## 1 OBJECTIF

La méthode de détermination de la matière organique par combustion du résidu à 550 °C permet de déterminer le pourcentage des cendres (matière minérale). Par la suite cette donnée, nous permettra de calculer le pourcentage de la matière organique contenue dans le résidu.

## 2 MATÉRIELS

- Four à 550 °C ;
- Contenant en porcelaine, 30 ml résistant à des températures élevées ;
- Papier aluminium ;
- Dessiccateur ;
- Balance analytique, précision de 0,01 ;
- Spatule, cuillère, etc. ;
- Four réglable à une température constante et uniforme de  $105\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  ;
- Coupelles en aluminium.

## 3 MÉTHODOLOGIE

1. Peser approximativement 5 g de résidu dans une coupelle ;
2. Mettre à sécher dans le four à 105 °C pendant 16 h ;
3. Peser le contenant de porcelaine vide ;
4. Peser 2 g du résidu séché dans le contenant en porcelaine ;
5. Noter le poids contenant + résidu ;
6. Placer le contenant + résidu dans le four à 550 °C ;
7. Laisser l'échantillon dans le four pendant 16 h ;
8. Sortir l'échantillon du four, le couvrir immédiatement avec du papier aluminium ;
9. Placer l'échantillon dans le dessiccateur, laisser environ 6 h ;
10. Peser l'échantillon après qu'il soit bien refroidi dans le dessiccateur ;
11. Noter le poids du contenant + cendres ;
12. Remettre une deuxième fois l'échantillon dans le four à 550 °C, et le laisser pendant environ 3 h ;
13. Répéter les opérations 9 à 11 ;
14. Si le poids entre la première pesée et la deuxième est constant passer aux calculs ;  
Sinon refaire les étapes 12 et 13 jusqu'à ce que le poids soit constant.

**Recommandations :** Avant de mettre l'échantillon dans le four à 550 °C, il est préférable de maintenir la température de celui ci à 375 °C pendant 1h. Ensuite placer l'échantillon. Dans notre cas le four n'est pas réglable, donc il nous est impossible d'obtenir un profil de température.

#### 4 CALCULS

##### Calcul du % des cendres

$$\text{Cendres, g/100g} = [(a - c)/(b - c)] \times 100$$

Où, a = poids (g) final du contenant + cendres

b = poids (g) initial du contenant + résidu

c = poids (g) du contenant vide


##### Calcul du % de la matière organique

$$\% \text{ matière organique} = 100 - \% \text{ cendres (calculé dans 1)}$$

#### 5 RÉFÉRENCE(S)

ASTM D2974 1988 (Soil Sampling and Methods of Analysis. M.R. Carter (Ed)  
Canadian Society of Science.

### Protocole 35-D : Extraction alcaline de la tourbe de sphaigne : séparation en acides humiques et fulviques

 <p><b>Chaire industrielle CRSNG</b></p> <p style="text-align: center;"><i>en assainissement et gestion des sites</i></p>	<h2 style="margin: 0;">PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</h2>
Protocole # : P 35 - D	Nombres de pages : 8
Version : 1/1	Date : juin 99-juillet 99
Auteur(s) : <u>Cristina Balasoïu</u>	
Approuvé par :	Signatures :
Manon Leduc	<input type="checkbox"/> _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
Gérald Zagury	

- Titre : Extraction alcaline de la tourbe de sphaigne : séparation en acides humiques et fulviques

Mots clé : tourbe de sphaigne, matière organique, humus, acides fulviques, acides humiques, sol



## 1 OBJECTIF(s)

L'objectif principal de ce protocole est d'estimer la quantité des acides humiques et des acides fulviques présente dans l'humus du sol. Dans le cadre du projet on va utiliser une tourbe de sphaigne comme source de matière organique. La tourbe de sphaigne est procurée par *Les Tourbières Berger (Berger Peat Moss)*, 121 R.R. 1, St – Modeste, GOL 3W0, Québec, tél. : (418) 862 – 4462, fax (lab) : (418) 862 - 1295.

L'essai sera réalisé en duplicata.

## 2 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

### 2.1 MATÉRIEL

- 1 balance de 0,01 de précision ;
- 1 tamis no. 18 (1 mm) ;
- 1 agitateur à culbutage (type end – over – end), 60 rpm ;
- 1 pH – mètre de marque ACCUMET model 25 ;
- 1 agitateur magnétique
- 2 barreaux magnétiques ;
- 4 bouteilles à centrifugeuse 250 ml en polypropylène, avec bouchon, résistantes à 9000 rpm
- 1 centrifugeuse de marque BECKMAN, J2 – 21 ;
- 1 rotor de centrifugeuse marque JA – 10 ;
- 2 cylindres gradués (1 x 50 ml, 1 x 250 ml)
- 1 pipette 25 ml ;
- 2 bêchers en verre 250 ml ;
- 1 poire à pipette ;
- ballons volumétriques (1 x 250, 2 x 500 ml) ;
- 1 burette 25 ml ;
- 1 hotte chimique ;
- 1 bonbonne d'azote ;
- 2 coupelles en aluminium ;
- 1 étuve ;
- 1 dessiccateur ;
- bouteilles de 500 ml avec bouchon vissable pour les solutions de NaOH 0,5M, HCl 6M, et HCl 0,5M ;
- 1 spatule en aluminium ;
- coupelles en aluminium grandes ;
- parafilm.

## 2.2 RÉACTIFS

Acide chlorhydrique (HCl) 0, 5M ( AC 4955, lot 298294 ) ;

Acide chlorhydrique (HCl) 6M, ( AC 4955, lot 298294 ) ;

- Hydroxyde de sodium (NaOH) 0.5M, ( AC 8370, lot 790821 – S7<sub>1</sub>) ;
- Eau déionisée.

## 3 MÉTHODOLOGIE

### Préparation des solutions :

#### Acide chlorhydrique (HCl) 0, 5M

Il faut prendre en compte le fait que l'ajout de l'acide chlorhydrique concentré dans l'eau est une réaction exothermique. De plus, il faut préparer la solution dans une hotte chimique.

Dans un ballon volumétrique de 500 ml ajouter environ 200 ml d'eau déionisée et mesurer 20,8 ml d'acide chlorhydrique concentré (12 N) à l'aide d'une pipette de 25 ml. Agiter doucement pour éviter la surchauffe du ballon. Compléter avec de l'eau déionisée jusqu'au volume de 500 ml.

On va utiliser 150 ml solution HCl 0,5M /analyse, donc 300 ml / échantillon en duplicata.

#### Acide chlorhydrique (HCl) 6 M

Il faut prendre en compte le fait que l'ajout de l'acide chlorhydrique concentré dans l'eau est une réaction exothermique. De plus, il faut préparer la solution dans une hotte chimique.

Dans un ballon volumétrique de 250 ml ajouter environ 100 ml d'eau déionisée et mesurer 125 ml d'acide chlorhydrique concentré (12N) à l'aide d'un cylindre gradué de 250 ml. Agiter doucement pour éviter la surchauffe du ballon. Compléter avec de l'eau déionisée jusqu'au volume de 250 ml.

#### Hydroxyde de sodium (NaOH) 0.5 M

Il faut prendre en compte le fait que la dissolution du NaOH dans l'eau est une réaction exothermique.

Dissoudre 10 g de NaOH dans un ballon volumétrique de 500 ml dans lequel il y a environ 200 ml d'eau déionisée. Agiter doucement pour éviter la surchauffe du ballon. Éventuellement, refroidir le ballon sur un jet d'eau. Une fois que la solution est bien homogène, compléter avec de l'eau jusqu'au volume de 500 ml.

Le pH de la solution doit être d'environ 13,5. La solution de NaOH ainsi préparée doit être tenue dans une bouteille à bouchon visible couverte avec un parafilm pour éviter l'absorption du  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère. Il est préférable de préparer et d'utiliser la solution de NaOH dans le jour même.

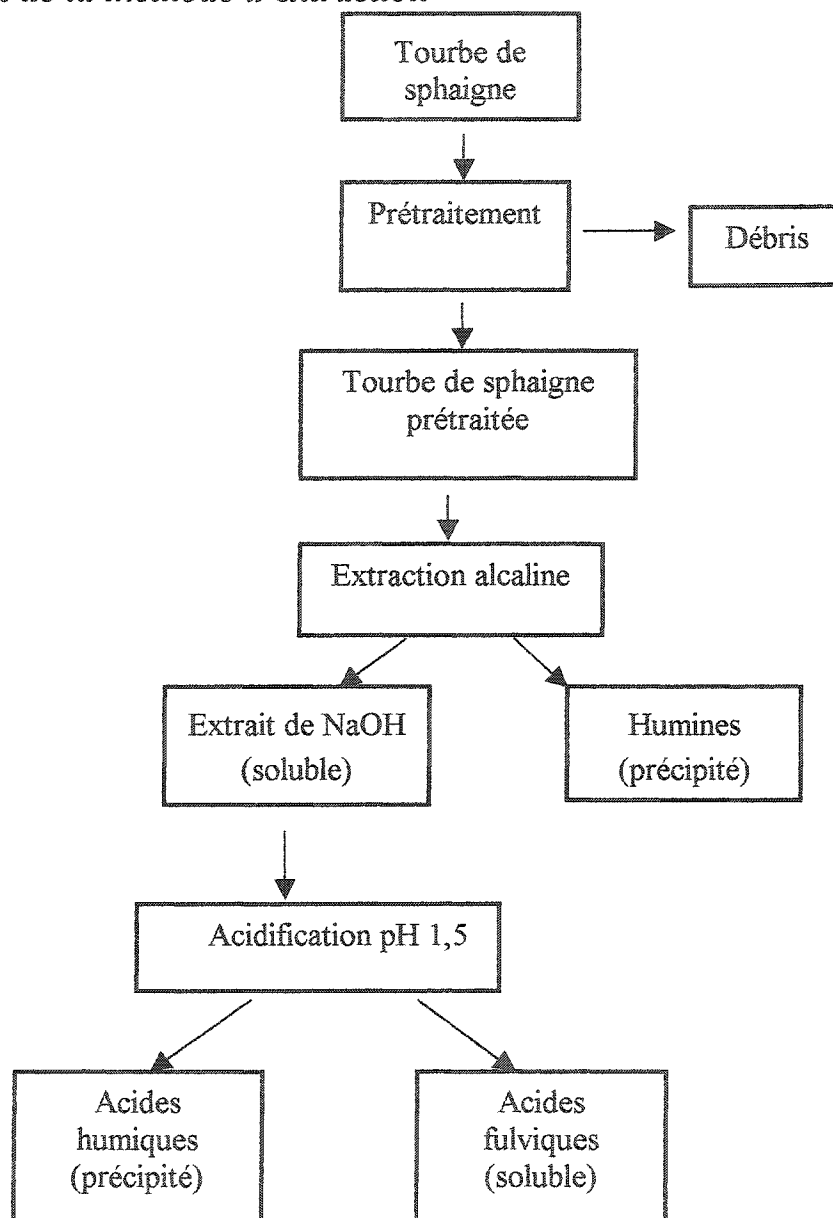
On va utiliser 150 ml solution HCl 0,5M /analyse, donc 300 ml / échantillon en duplicata.

### 3.3 Procédure d'extraction

#### 3.3.1 Prétraitement de l'échantillon

Cette étape a pour but d'enlever les débris qui flottent et les formes inorganiques de C, N, P et S. Pour évaluer la quantité de tourbe qui reste après l'étape de prétraitement, un autre échantillon de tourbe sera analysé en parallèle (on va le noter X). Cette analyse sera faite en duplicata.

1. Sécher la tourbe à l'air libre pendant une nuit ;
  2. Tamiser à 1 mm la tourbe de sphagnum à l'aide d'un tamis no. 18 ;
  3. Déterminer la teneur en eau de la tourbe conformément au protocole A7 sur un échantillon parallèle ;  
Noter le poids d'eau présente: (a) ;
  5. Peser environ 15,00 g de tourbe de sphagnum dans la bouteille à centrifugeuse ; Noter le poids : (A) ;  
Noter le poids de tourbe sèche :  $A' = A - a$
  6. Ajouter 150 ml de HCl 0,5 M au cylindre gradué ;
  7. Mettre de côté pour une heure et agiter de temps en temps ;
  8. Centrifuger à 9000 rpm pour 15 minutes ;
  9. Décanter avec attention et jeter le surnageant ;
  10. Ajouter 150 ml de l'eau déionisée au cylindre gradué dans la bouteille à centrifugeuse pour laver la tourbe de l'acide chlorhydrique résiduel et mélanger manuellement ;
  11. Centrifuger à 9000 rpm pour 15 minutes ;
  12. Décanter avec attention et jeter le surnageant ;
- Pour l'échantillon X : essayer de recueillir tout le précipité, en ajoutant, à la fin, un peu d'eau pour bien enlever le reste.

*Schéma de la méthode d'extraction*

### 3.3.1.1. Déterminer la quantité de tourbe après l'étape de prétraitement

Cette sous étape est faite pour évaluer le poids de la tourbe qui reste après l'étape de prétraitement. On fait les analyses pour l'échantillon de tourbe préparé séparément dans la section 3.3.1 (échantillon X).

1. Mettre au dessiccateur deux coupelles en aluminium pour une nuit ;
2. Peser les coupelles sèches à la balance analytique ; Noter le poids ;
3. Ajouter avec attention le précipité humide obtenu dans la section 3.3.1, l'étape 11 ;
4. Sécher le précipité dans l'étuve à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 48 h ;
5. Refroidir au dessiccateur pour minimum une heure ;
6. Peser le précipité sec ; Noter le poids : A''
7. Réintroduire le précipité à l'étuve pendant 3 heures ;
8. Refroidir au dessiccateur pendant 30 minutes ;
9. Peser le précipité sec ; S'assurer que la masse est constante ;

### 3.3.2 Extraction alcaline

1. Ajouter 150 ml de NaOH 0,5 M au cylindre gradué dans la bouteille à centrifugeuse ;
2. Barboter de l'azote dans la bouteille à centrifugeuse pour enlever l'oxygène et fermer rapidement le bouchon ;
3. Poser la bouteille sur un agitateur à culbutage (60 rpm) et laisser la pour 18 heures ;
4. Centrifuger à 9000 rpm pour 15 minutes pour séparer l'extrait de NaOH et le résidu de tourbe.
5. Décanter avec attention et garder le surnageant (l'extrait de NaOH) dans une bouteille à centrifugeuse ;
6. Transvaser le précipité (le résidu de l'extraction, les humines) avec une spatule dans une coupelle en aluminium préalablement pesée ; Identifier les échantillons ;
7. Peser le précipité humide à la balance analytique ; Noter le poids ;
8. Sécher le précipité dans l'étuve à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 48 h ;
9. Refroidir au dessiccateur pour minimum une heure ;
10. Peser le précipité sec (les humines) ; Noter le poids : (B) ;
11. Réintroduire le précipité à l'étuve pendant 3 heures ;
12. Refroidir au dessiccateur pendant 30 minutes ;
13. Peser le précipité sec ; S'assurer que la masse est constante.

### 3.4 Procédure de séparation

1. Poser la bouteille avec l'extrait de NaOH sur un agitateur magnétique ;
2. Introduire l'électrode de pH dans la bouteille et s'assurer qu'elle est tout le temps en contact avec l'extrait de NaOH ;
3. Ajouter progressivement (goutte à goutte) de l'acide chlorhydrique 6 M à l'aide d'une burette jusqu'au pH 1,5. L'acidification de l'extrait provoque la précipitation d'une portion de la matière organique. Le précipité ainsi formé a une couleur qui peut varier de marron foncé jusqu'à noir et il est nommé AH (acides humiques). Le surnageant a une couleur jaunâtre et il est nommé AF (acides fulviques).  
Noter les observations (couleur, consistance, etc.) au cahier de laboratoire ;

4. Centrifuger à 9000 rpm pour 15 minutes pour séparer les acides humiques et les acides fulviques ;
5. Décantier avec attention et garder le surnageant (les acides fulviques) dans une bouteille de 250 ml (AF) ; Mesurer le volume ;
6. Déterminer la teneur en eau du précipité (acides humiques) conformément aux étapes 12 - 19 de la section 3.3.2 ; Noter le poids sec : (C).

#### 4. RÉSULTATS :

Les calculs sont faits par bilan de masse.

- Soit :    A - poids de tourbe humide ;  
           A' - poids de tourbe sèche ;  
           A'' - poids de tourbe après prétraitement ;  
           B - poids des humines secs ;  
           C - poids des acides humiques secs ;  
           X - poids des débris secs.

Calculs :

$$X = A' - A''$$

$$\% \text{ de débris} = 100 * X/A'$$

$$\% \text{ de humines} = 100 * B/A'$$


$$\% \text{ des acides humiques} = 100 * C/A'$$

$$\% \text{ des acides fulviques} = 100 - \% \text{ de débris} - \% \text{ de humines} - \% \text{ des acides humiques}$$

#### 5 RÉFÉRENCE(S)

Soil Sampling and Methods of Analysis, Chap. Soil Humus Fractions, M.Carter ed, Lewis Publisers, 1993, p. 391 – 395.

**Protocole P54-C : Détermination du carbone organique dissous (COD) d'un matériel organique et de l'absorptivité de masse spécifique (MSA) du COD**

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54-C		Nombres de pages : 6	
Version : 1		Date : 3.04.2002	
Auteur(s) : <u>Simona Dobran</u> _____			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> _____		Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	
<u>Gérald Zagury</u> _____			

Titre : Détermination du carbone organique dissous (COD) d'un matériel organique et de l'absorptivité de masse spécifique (MSA) du COD.
Mots clé : stabilité et maturité d'un matériel organique, carbone organique soluble, degré d'humification

## 1 OBJECTIF

L'objectif de ce protocole est de déterminer le contenu de carbone organique dissous (COD) d'un matériel organique (e.g. la tourbe de sphaigne et le fumier de poulet composté) et l'absorptivité de masse spécifique (MSA) du COD (en triplicata). Ces paramètres reflètent le degré d'humification d'un matériel organique et seront considérés dans le choix d'un matériel organique comme source de matière organique dans la constitution des sols artificiels contaminés avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté (CCA).

## 2 THÉORIE

La fraction dissoute du carbone d'un matériel organique (ou d'un sol) est considérée une source importante de carbone qui assure la respiration des microorganismes hétérotrophes. (Jandl et Sollins, 1997 ; Pascual *et al.*, 2000). Le carbone organique dissous (COD) est une sous-fraction du COT et représente la quantité de carbone présente dans les matières organiques dissoutes (après la filtration de l'échantillon sur une membrane de porosité de 0,45  $\mu\text{m}$ ). Une bonne partie du  $\text{CO}_2$  produit par la minéralisation du carbone organique provient de la minéralisation du carbone organique dissous. (Nguyen, 1999 ; Hsu et Lo, 2001). Ainsi, un faible contenu en COD signifie un matériel organique composté et stable ou la plupart des substances facilement biodégradables ont été consommées.

Un autre paramètre important pour la détermination du degré d'humification d'un matériel organique est l'absorptivité de masse spécifique (MSA), soit la constante de proportionnalité de la loi de Beer. En général, les substances humiques retrouvées dans l'extrait d'un matériel organique dans l'eau, absorbent la lumière dans la gamme UV-Visible selon la loi de Beer. Le paramètre MSA représente l'absorbance à 420 nm des substances humiques retrouvées dans l'extrait filtré (membrane de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ ) par unité de concentration et unité de longueur de la cuve, soit  $\text{L} / \text{mg} \times \text{m}$ . L'augmentation de la valeur de MSA est reliée à une augmentation de substances humiques récalcitrantes à la biodégradation (Wu *et al.*, 2000).

## 3 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Spectrophotomètre Varian Cary 100 Bio
- Balance analytique
- Cellules de quartz, rectangulaires (1 cm de long, capacité de 3 ml)
- Filtres en nitrate cellulose de 0,45  $\mu\text{m}$ ,  $d = 47 \text{ mm}$  (Leifeld *et al.*, 2001)
- Buchner à vide (8)
- Erlenmeyer 250 ml à vide(8)
- Erlenmeyer 250 ml(8)



- Erlenmeyer 250 ml(8)
- Agitateur à culbutage, 60 rpm
- Bouteilles à centrifugeuse 500 ml en polycarbonate(8)
- Cylindre gradué 200 ml
- Centrifugeuse de marque BECKMAN, J2-21
- Rotor de centrifugeuse marque JA-10
- Eau deionisée

#### 4 MÉTHODOLOGIE

La détermination de COD repose tout d'abord sur l'extraction de substances solubles dans l'eau deionisée et filtration de l'extrait sur une membrane de porosité de 0,45  $\mu$ m. Ensuite, le COD sera déterminé sur un aliquot de l'extrait filtré chez Philip Services Analytiques selon la Méthode Standard 5310 B par combustion –IR (limite de détection de 0,05mg/l). Un autre aliquot du même extrait filtré sera utilisé pour la détermination de l'absorbance à une longueur d'onde de 420 nm en vue de calculer le paramètre MSA.

#### 5 PROCÉDURE

**5.1. Extraction de carbone organique dissous dans l'eau (COD), g/kg matériel sec)** de la tourbe et du fumier de poulet (en triplicata plus 1 blanc d'expérience) (Wu et Martinez, 2000).

**Recommandations :** Des précautions spéciales doivent être prises pour le lavage de tout le matériel. Une contamination avec des matières organiques va affecter les valeurs de COD des blancs et des échantillons faibles en COD. Ainsi, tout le matériel (sauf les bouteilles en polycarbonate ) sera lavé avec de l'acétone et ensuite rincer 3 fois avec de l'eau distillée et 3 fois avec de l'eau deionisée. Les bouteilles en polycarbonate seront lavées à l'eau distillée et séchées. Un blanc (l'eau deionisée ) sera filtré en parallèle et envoyé pour l'analyse de COD.

Il est conseiller d'expédier les échantillons pour l'analyse de COD le plutôt possible en bouteilles destinées à cette fin procurées du laboratoire externe (Philip Analytiques) .

Si non, les échantillons peuvent être conservés quelques jours (jusqu'à 5 jours) en bouteilles en verre bien lavées, au noir à 4 degrés C.

1. Préparer les échantillons de matériels organiques selon l'étape 5.1 protocole P-54 B .
2. Peser environ exactement 20,0000 gr matériel organique humide dans une bouteille à centrifugeuse en polycarbonate de 500 ml.( en triplicata, 6 bouteilles ) (Faire en parallèle l'analyse de poids sec des matériels organiques)
3. Ajouter 1 bouteille à centrifugeuse pour le blanc d'expérience pour chacun de matériels organiques .

5. Poser les bouteilles sur un agitateur à culbutage et agiter pendant 2 heures.
6. Centrifuger les suspensions 10 min. à 8700 rpm . (13776 g )
7. Transvaser les surnageants , en les décantant, dans les Erlemeyers identifiés.
8. Installer 8 entonnoirs Buchner sur 8 Enrelemeyers à vide de 250 ml.
9. Déposer 8 filtres en nitrate cellulose (diamètre pores = 0.45um , diamètre filtre = 47 mm ) sur les entonnoirs.
10. Filtrer chacun de surnageants en mouillant en premier le centre du filtre.
11. Expédier un aliquote (environ 100 ml) de chaque filtrat chez Philips Services Analytiques dans des bouteilles spéciales à cette fin pour l'analyse de COT. (pour les précautions qui doivent être prises jusqu'à l'expédition voir les recommandations)
12. Un autre aliquot sera traité selon l'étape 4.2 immédiatement.

## 5.2 Détermination de l'absorbance à 420 nm (en triplicata plus le blanc de l'expérience)

1. Rincer la cellule de quartz à l'eau distillée et ensuite à l'acétone. Faire sécher à l'air comprimé la cellule de quartz. (Utiliser la même procédure de rinçage entre chaque utilisation de la cellule.)
2. Transférer une portion de filtrat dans la cellule en quartz et installer la cellule dans un faisceau devant la cellule avec le blanc de l'expérience dans le spectrophotomètre.
3. Faire la lecture d'absorbance des échantillons à 420 nm.
4. Après la lecture disposer les solutions à l'évier.

### Calculs de MSA

$$MSA = A / c \times l, L / mg \times m$$

A : l'absorbance lue au spectrophotomètre

c : concentration de COT de l'extrait filtré (COD) , mg/L

l : la longueur de la cellule en quartz =  $10^{-2}$  m

## 6 RÉFÉRENCE(S)

HSU, J.H et LO, S.L. (2001). Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese and zinc from swine manure. Environmental Pollution, 114, 119-127.

JANDL, P. et SOLLINS, P. (1997). Water-extractable soil carbon in relation to the belowground carbon cycle. Biol. Fertil. Soils , 25, 196-201.

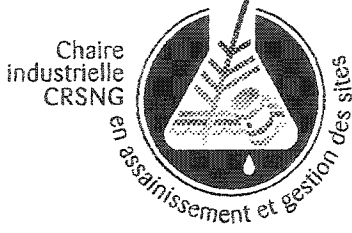
LEIFELD, J., SIEBERT S. et KOGEL-KNABNER, I. (2001). Stabilization of composted organic matter after application to a humus-free sandy mining soil. Journal Environmental Quality, 30, 602-607.

NGUYEN, L. (1999). Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel - bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters, Ecological Engineering, 16, 199-221.

PASCUAL, J.A., GARCIA, C., HERNANDEZ, T., MORENO, J.L. et ROSS, M. (2000). Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. Soil Biology and Biochemistry, 32, 1877-1883.

WU, L. Ma, L.Q et MARTINEZ, G.A. (2000). Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. Journal of Environmental Quality, 29, 424-429.

## Protocole P54-D : Détermination des substances facilement disponibles (SFD) de la tourbe et du fumier de poulet composté

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54-D		Nombres de pages : 7	
Version : 3/3		Date : 30.04.2002	
Auteur(s) : <u>Simona Dobran</u> _____ _____			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Gérald Zagury</u> _____		Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Titre : Détermination des substances facilement disponibles (SFD) de la tourbe et du fumier de poulet composté</li> </ul>
Mots clé : composition de la matière organique, biodégradation de la matière organique, substances facilement disponibles.

## 1 OBJECTIF

L'objectif de ce protocole est de déterminer le contenu de substances facilement disponibles aux microorganismes (SFD) de la tourbe de sphaigne et du fumier de poulet composté (en duplicata) en vue de faire le choix de la source de matière organique appropriée d'un sol synthétique contaminé avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté (CCA).

## 2 THÉORIE

En général, la matière organique retrouvée dans un sol est composée de deux fractions :

- une fraction labile facilement décomposable qui servira comme source de carbone disponible aux microorganismes du sol et qui favorise l'activité microbienne du sol.
- une fraction récalcitrante à la décomposition (surtout pendant des essais de laboratoire de court terme). Cette fraction est composée de substances humiques (e.g. acides humiques, fulviques et les humines du sol) qui représente, en général, 65-75 % de la matière organique d'un sol naturel.

En ce qui concerne un matériel organique, la fraction biodégradable est représentée par les substances facilement disponibles (SFD). Pour déterminer le contenu de substances facilement disponibles (SFD) de la tourbe et du fumier de volaille, qui vont constituer la source de matière organique des sols dans le cadre du projet, une version simplifiée de la méthode Forage Fibre Analysis sera appliquée. La méthode Forage Fibre Analysis est une méthode largement utilisée dans le domaine agronomique pour évaluer la dégradabilité d'un matériel organique (Prasad *et al.*, 1999; Goering et Van Soest, 1970).

## 3 MÉTHODOLOGIE

La procédure repose sur l'extraction avec reflux par une solution de 5% HCl de la fraction SFD du matériel organique, qui contient des sucres solubles, de l'hémicellulose, des aminoacides et certaines protéines. Plus le pourcentage de SFD extraits par l'acide est grand plus le matériel organique est facilement décomposable. (Prasad *et al.* 1999; Goering et Van Soest, 1970)

## 4 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

### 4.1 Matériels

- Balance de 0,0001 de précision
- Creusets de type Gooch fritté de 50 ml (2)
- système de filtration sous vide (2)
- Erlenmeyer à vide de 1000 ml munis de joints d'étanchéité en liège (2)

- Systèmes de digestion avec reflux (2)
- ballons de 500 ml à fond rond (2)
- Ballons volumétriques 500 ml et 1000 ml(2)
- Calottes chauffantes (2)
- Condensateurs (2)
- Pipette sérologiques jetable stérile 100ml , 25 ml
- Cylindres gradués (25 ml , 250 ml, 500 ml )(3)
- Bouteilles de 500 ml et 1000 ml avec bouchon visible pour les solutions préparées
- Hotte chimique
- eau déionisée
- Dessiccateur
- Four (40 ° C, 100 ° C)
- Assiettes grandes d'aluminium
- Pince pour les creusets et pour les billes
- Tourbe de sphaigne (Jardinière) tamisée à un d < 1mm (tamis no.14 et no.18)
- Fumier de poulet composté (Fertilo de Fafard) tamisé à un d < 1mm (tamis no.14 et no.18)

#### 4.2. Réactifs

- Acide nitrique concentré, 70 % .
- Acétone 90% (v/v). Dans un ballon de 500 ml mesurer avec un cylindre 450 ml d'acétone (AC-grade HPLC) et compléter avec de l'eau deionisée jusqu'à la jauge. (80 ml /échantillon x 4 )
- HCl 5% (p/p) (d= 1.0230 g/ml) .Dans un ballon volumétrique de 1000 ml ajouter 800 ml d'eau deionisée. Mesurer 116,66 ml HCl concentré, 12 N (d= 1.19 g/ml) à l'aide d'une pipette et ajouter dans le ballon volumétrique. Agiter par petites rotations pour éviter la surchauffe du ballon. Compléter avec de l'eau deionisée jusqu'à jauge (200 ml/ échantillon x 4).

#### Calculs :

$$m \text{ HCl } 5\% = 1000 \text{ ml} \times d \text{ HCl } 5\%(\text{g/l}) \times 5 \text{ g}/100 \text{ g} = 51,15 \text{ g HCl}$$

$$\text{Nombre de moles HCL, } n = 51,15/36,5 = 1,4 \text{ moles HCl}$$

$$\text{Nombre d'équiv.-gram} = 1,4$$

$$C2 = 1,4 \text{ N}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$12 \times V1 = 1,4 \times 1000$$

$$V1 = 116,66 \text{ ml HCl } 12\text{N}$$

## 5 PROCÉDURE

**Recommandations :** Le protocole sera appliqué 2 fois, soit pour chaque matériel organique, tourbe et fumier de volaille composté. Il est important de bien nettoyer les creusets avant leur utilisation. Ainsi, sous la hotte chimique faire bouillir les creusets dans l'acide nitrique concentré, jusqu'à ce qu'ils deviennent blancs. Ensuite, rincer les creusets avec d'eau distillée et deionisée. Après le rinçage, les creusets seront identifiés avec un crayon rouge résistant à l'acide, introduits à l'étuve (105 degrés C) pendant une nuit et ensuite refroidis au dessiccateur pendant une heure.

Toutes les pesées seront effectuées sur la balance analytique avec une précision de 0,0001 g, bien calibrée à chaque utilisation.

La manipulation des creusets pesés doit se faire à l'aide d'une pince et/ou de gants propres et secs.

- 5.1. Peser une quantité d'environ 20,00 g de chaque matériel organique (préalablement préparés selon l'étape 5.1 du protocole P-54 B ) dans des assiettes d'aluminium.
- 5.2. Faire sécher les échantillons pendant la nuit dans le four à 100 ° C.
- 5.3. Refroidir les échantillons au dessiccateur pendant une demi-heure.
- 5.4. Peser 2 creusets de type Gooch frittés identifiés de 50 ml et noter le poids (PC1. (précision 0,0000 g)
- 5.5. Ajouter environ exactement 2,5000 g de matériel organique séché (duplicata) dans les creusets et peser (PC11).( Faire en parallèle le poids sec des échantillons séchés selon le protocole PA 7)
- 5.6. Installer les creusets sur les Erlemeyers de 1000 ml avec les joints d'étanchéité à liège et connecter au système de filtration sous vide.
- 5.7. Rincer les échantillons en ajoutant 20 ml d'acétone 90% à l'aide d'un cylindre gradué.
- 5.8. Utiliser un vide faible au début du filtrage et augmenter le vide seulement au besoin.
- 5.9. Répéter 3 autres fois les étapes 5.6 -5.7 et disposer le filtrat (les lipides, résines et cires) .
- 5.10 Rincer les précipités avec de l'eau deionisée (au moins 4 fois) et filtrer à l'aide d'un système de filtrage sous vide.
- 5.11. Sécher les creusets avec les précipités dans le four à 40 ° C pendant la nuit.
- 5.12. Refroidir les creusets au dessiccateur pendant un demi –heure.
- 5.13. Répéter le cycle séchage au four- refroidissement creusets jusqu'au poids constant. Ainsi, peser les creusets avec les précipités séchés et noter le poids.( P1)
- 5.14. Placer les ballons de digestion sur une balance tarée à zéro.
- 5.15. Transférer les résidus dans les ballons de digestion de 500 ml identifiés.
- 5.16. Peser les résidus et noter le poids. (PC22 p)
- 5.17. Transférer dans chacun de ballons, 20 billes en verre, préalablement pesées (Pb).

- 5.18. Entre temps, laver à nouveau les creusets à l'acétone (ou si le temps le permettre à l'acide nitrique), et les faire sécher pendant une demi-heure à l'étuve (105 degré C). Ensuite, refroidir les creusets au dessiccateur jusqu'au leur réutilisation.
- 5.19. Ajouter 200 ml de HCl 5% dans chaque ballon de digestion avec le cylindre gradué et faire la digestion à reflux pendant 1 h.
- 5.20. Refroidir l'extrait (des sucres solubles, amidon, amino -acides et hemicellulose).
- 5.21. Peser à nouveau les creusets Gooch frittés de 50 ml.( PC2) .
- 5.22. Installer les creusets sur un système de filtrage par vide.
- 5.23. Transférer l'extrait dans les creusets.
- 5.24. Rincer les ballons avec 3 portions d'eau.
- 5.25. Filtrer les extraits.
- 5.26. Rincer avec de l'eau d'ionisée jusqu'à la neutralité. (Vérifier le pH de filtrat avec un pH-mètre)
- 5.27. Disposer les filtrats (hémicellulose et polysaccharides) après la vérification du pH.
- 5.28. Sécher les creusets avec les précipités pendant la nuit à 40 ° C.
- 5.29. Répéter le cycle séchage au four- refroidissement creusets jusqu'au poids constant. Peser les creusets avec les précipités secs et noter le poids (P2).

## 6 CALCULS

- Contenu de lipides, résines et cires, R :

$$R(\%) = 100 \times \{ (PC11-PC1) - (P1-PC1) \} / (PC11- PC1)_{\text{sec}}$$

PC1- poids creuset Gooch, g (5.3)

P1- poids creuset Gooch avec l'échantillon séché après l'enlèvement de résines, lipides et cires, g (5.13)

PC11- poids creuset avec 2,5000 g matériel organique, g

(PC11-PC1 ) sec - poids sec du matériel organique, calculé selon le protocole PA7

- Concentration de substances facilement disponibles SFD (mg/g matériel organique sec)

$$C_{\text{SFD}} = \{ PC22 \text{ p} - (P2-PC2- Pb) \} \times 10^3 / (PC11- PC1)_{\text{sec}} - P$$

PC2- poids creuset Gooch, g (5.21)

PC22 t- poids théorique du résidu avant digestion = P1-PC1, g

PC22 p- poids pratique du résidu avant digestion, g

P2- poids creuset avec le précipité sec, g (5.29)

Pb- poids des billes en verre, g

P- pertes = PC22 t - PC22 p, g

(PC11-PC1-P) sec- poids sec (à 105<sup>0</sup> C) de l'échantillon séché à 100<sup>0</sup> C

Le contenu de SFD:



$$\text{SFD (\%)} = 100 \times \{ \text{PC22 p} - (\text{P2-PC2} - \text{Pb}) \} / (\text{PC11- PC1})_{\text{sec}} - \text{P}$$


## 7 RÉFÉRENCE(S)

GOERING H.K. et VAN SOEST, P.J. (1970). Forage Fiber Analyses. Agricultural Handbook No 379, U.S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C. USA, 1-20.

PRASAD, D., WAI, M., BÉRUBÉ, P. et HENRY, J.G. (1999). Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage. Environmental Technology, 20, 449-458.

**ANNEXE C : Protocoles expérimentaux. Essais en macrocosmes.**

## Protocole APSO23 : Capacité de rétention d'eau au champ d'un échantillon de sol.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : psoA23		Nombres de pages : 4	
Version : 1		Date : 1-01-02	
Auteur(s) : Manon Leduc			
Approuvé par :		Signatures : <span style="float: right;">Date :</span>	
<div style="border-bottom: 1px solid black; height: 1.2em; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 1.2em; width: 100%;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 1.2em; width: 100%;"></div>		<input type="checkbox"/> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 100%;"></div>	
		<input type="checkbox"/> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 100%;"></div>	
		<input type="checkbox"/> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 100%;"></div>	

- Titre : Capacité de rétention d'eau au champ d'un échantillon de sol

Mots clés : eau, sol, capacité, rétension

## 1 DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode convient pour un sol de composition médiane en argile et en matière organique.

## 2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Traduction et adaptation de la méthode de la détermination de la Capacité de la Rétention au Champ (Water-Holding Capacity, WHC) pour un échantillon de sol selon Martin R. Carter, Canadian Society of Soil Science, S 593 S 66 1993. La méthode consiste en un trempage et un drainage, le sol est suspendu dans de l'eau pour trente minutes suivit d'une filtration par gravité. Le résultat représente la quantité maximale d'eau retenue par gramme de sol sec.

## 3 MATÉRIEL

- 1 échantillon de sol suffisamment gros 100g ou 250ml
- 400ml d'eau distillée
- 2 béchers de 600ml
- Balances précision de 0.01g et 0.0001g
- 1 Spatule en acier inoxydable
- 1 Plaque chauffante
- 1 thermomètre pouvant atteindre 100°C
- 1 tige de verre
- 1 minuteur
- 1 support à entonnoir
- 1 entonnoir Buchner Coors No 60240
- 1 papier filtre Whatman GF/C de 47mm
- 3 coupelles préalablement identifiées, séchées et pesées 0.0001g
- four 105°C
- dessiccateur

## 4 MODE OPÉRATOIRE

1. Dans un bécher de 600ml peser 100g à 0.01g près de sol ou additionner un volume maximal de 250 ml de sol.
2. Dans un autre bécher de 600ml chauffer 400ml d'eau distillée à 70°C.
3. Ajouter au bécher contenant le sol suffisamment d'eau pour produire une suspension.
4. Agiter à l'aide d'une tige de verre pour 1 à 2 minutes.
5. Laisser reposer la suspension pendant 30 minutes.
6. Agiter de nouveau de 1 à 2 minutes pour chasser les bulles d'air emprisonner.

7. Sur un support à entonnoir installer un entonnoir Buchner Coors No 60240 muni d'un filtre de papier Whatman GF/C de 47mm de diamètre, placer un b cher de 600ml sous le Buchner pour recueillir l'eau de la filtration.
8. Transvaser la suspension sur le filtre dans le Buchner.
9. Attendre la fin de la filtration, c'est-  dire la dernière goutte passante (quelques minutes à plusieurs heures d'attente selon la composition du sol).
10. Prélever 3 portions de sol saturé en eau au dessus du filtre à l'aide d'une spatule et les déposer dans des coupelles préalablement identifier et peser 0.0001g (P1).
11. Immédiatement peser (0.0001g) les coupelles contenant le sol saturé en eau (P2).
12. Sécher le sol au four à 105  C pendant 16h.
13. Refroidir au dessiccateur pour 30 minutes.
14. Peser (0.0001g) les coupelles avec le sol sec (P3).

## 5 CALCULS

Capacité de Rétention au Champ par gramme se sol sec (CRCss).

$$\text{CRCss} = (P2-P1) - (P3-P1) / (P3-P1) \quad \text{g d'eau / g de sol sec}$$

P1 = poids de la coupelle (g)

P2 = poids du sol saturé en eau (g)

P3 = poids du sol sec (g)


## 6 LIMITE(S) DE LA MÉTHODE

1. Ce test n'est pas réalisable pour les sols trop argileux .
2. Le séchage de l'échantillon à 105 C ( tape 4. 12.) peut surestimé le contenu en eau, car à une température de séchage supérieur à 85 C peut provoquer la perte de matière organique dans certain sol.
3. Une difficulté de la méthode est la détermination de la fin de la filtration, à quel intervalle entre deux gouttes le drainage devient-il négligeable?
4. Le résultat représente l'affinité du sol pour retenir l'eau dans les conditions dont le sol est soumis à l'analyse. Ex : remanié, tamisé, séché, etc.
5. Pour un échantillon de taille différente utiliser un entonnoir Buchner et un filtre qui permettent de prélever le sol mouiller à l'aide d'une spatule en préservant l'intégrité de la portion de sol saturé en eau ( tape 4. 10.).

## 7 RÉFÉRENCE(S)

CARTER, M. R, Canadian Society of Soil Science, Cote S593 S 66 1993.

**Protocole P54-E: Échantillonnage d'un sol contaminé par As pour fin d'extraction de la microflore du sol.**

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54-E		Nombres de pages : 4	
Version : 1		Date : 15.08.2002	
Auteur(s): <u>Simona Dobran</u> _____ _____			
Approuvé par :		Signatures:	Date:
<u>Lucie Jean</u>		<input type="checkbox"/> _____	_____
<u>Gérald Zagury</u>		<input type="checkbox"/> _____	_____
<u>Louise Deschênes</u>		<input type="checkbox"/> _____	_____
_____			

Titre : Échantillonnage d'un sol contaminé par As pour fin d'extraction de la microflore du sol.  _____ _____
Mots clés : échantillonnage, CCA, poteaux téléphoniques  _____ _____ _____

## 1 OBJECTIF

Ce protocole vise à décrire la campagne d'échantillonnage d'un sol de surface (0-10 cm) contaminé par l'As, le Cu et le Cr à la base d'un poteau téléphonique pour fin d'extraction de la microflore.

## 2 MATÉRIEL

- Pelle, bêche de jardinage, râteau, masse, coupe-branche
- Tarrière ;
- Cuillères de plastiques;
- Sacs Whirlpack ;
- mètre rigide ;
- 1 chaudière de 20 L pour les déchets de rinçages;
- 1 chaudière contenant de l'acide nitrique 10 % pour le trempage ( 2 L acide nitrique 70 % qualité ACS+12 l d'eau du robinet);
- 1 contenant en plastique d'environ 4 l d'eau purifiée (nanaopure), préalablement rincés à l'acide nitrique 10 % (pour le rinçage) + un contenant pour transvider lors du rinçage
- 1 contenant en plastique d'environ 4 l d'eau du robinet avec un petit gobelet pour rincer;
- savon Sparkleen en solution, brosse;
- glacière;
- gants;
- papier essuie-tout Bounty ou guenille sans charpie;

## 3 MÉTHODOLOGIE

### 3.1. Choix de site

À noter dans le cahier de laboratoire :

1. Adresse (route, municipalité) ;
2. Transcrire les inscriptions visibles sur le poteau;
3. Observations et commentaires complémentaires;

### 3.2. Lavage des instruments

#### 3.2.1. Métalliques

1. Rincer à l'eau du robinet pour enlever les résidus majeurs à l'aide du contenant 4 L;
2. Brosser les surfaces avec une brosse à poils raides avec de l'eau du robinet et d'un détergent sans phosphate (Sparkleen );
3. Rincer à l'eau du robinet pour enlever le détergent à l'aide du contenant 4 L;
4. Rincer à l'eau purifié (nanopure) et essuyer avec une quenille propre;

Il est recommandé d'éviter le plus possible le contact des instruments métalliques avec les échantillons de sol à prélever. Les instruments devraient être employés dans la

délimitation de la zone de sol à échantillonner. Il est recommandé d'effectuer le prélèvement avec des instruments de plastique lorsque possible.

### 3.2.2. Plastique

1. Rincer à l'eau du robinet pour enlever les résidus majeurs à l'aide du contenant 4 L;
2. Brosser les surfaces avec une brosse à poils raides, de l'eau du robinet et d'un détergent sans phosphate ( Sparkleen);
3. Rincer à l'eau du robinet pour enlever le détergent à l'aide du robinet et d'un détergent sans phosphate. ( Sparkleen);
4. Rincer à l'eau du robinet pour enlever le détergent à l'aide du contenant 4 L;
5. Tremper à l'acide  $\text{HNO}_3$  10 %, 3 minutes;
6. Rincer deux fois à l'eau purifiée;

Une fois l'équipement décontaminé, son prochain contact est avec l'échantillon à prélever.

### 3.3. Contenants pour échantillonnage

Le sol prélevé sera déposé dans des sacs Whirlpack.

### 3.4. Échantillonnage

#### 3.4.1. Délimitation du bloc de sol à échantillonner

En tenant compte que l'échantillonnage est un destructeur du site, il ne sera pas possible de ré-échantillonner une deuxième fois dans la même place. Ainsi, l'échantillonnage sera réalisé à maximum 10 cm de profondeur à une distance radiale de 4 cm du poteau en couvrant la surface autour du poteau de 0 à 180 degrés. Si la quantité de sol à échantillonner n'est pas suffisante (voir le tableau 1), on envisage d'échantillonner autour du poteau de 180 à 360 degrés.

#### 3.4.2. Prélèvement de l'échantillon

Pour les échantillons de surface, on doit enlever la partie visible de la végétation ainsi que les racines. Pour ce faire on utilise une spatule ou pelle, si nécessaire, dans le sol afin de délimiter la surface à échantillonner. L'instrument est enfoncé juste assez profondément pour que la couche de végétation soit tranchée, pas plus de manière à ce que le sol devant être échantillonner. Ensuite, le carré de végétation est secoué de manière à ce que le sol adhérent aux racines se détache et retombe dans le carré de sol. Une fois la couche de végétation enlevée, le prélèvement du sol est réalisée à l'aide des instruments de plastiques. Ainsi, une tranchée est creusée jusqu'à proximité de la profondeur à échantillonner, soit à 2-3 cm sur une surface allant de 0 à 180 degrés. Ainsi, l'échantillonnage sera fait en allant de la distance radiale de 0 cm à une distance radiale de 2,5-5 cm de poteau et vers une profondeur de 5-10 cm à l'aide des instruments de plastique. Pour maximiser la quantité de sol à échantillonner, il est possible, aussi, de prendre le sol collé au poteau, mais sans gratter ce dernier.



Tableau C1 Analyses physico-chimiques et microbiologiques à effectuer et la quantité de sol requise à échantillonner

Analyses	Quantité sol (g)
As, Cr, Cu	10
Teneur en eau	10
pH	10
Solides volatils (%)	10
COD	40
Hétérotrophes totaux	10
Hétérotrophes tolérants à l'As(V)	10
Extraction microflore (P54-F)	50
Extraction microflore (P54-I)	50
Quantité total de sol	200


#### 4 CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de sols prélevés doivent être entreposés à 4 degrés C jusqu'aux analyses.

#### 5 RÉFÉRENCE(S)

Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales, Cahier 5, Echantillonnage des sols, MEF, 1995

**Protocole P54-F : Extraction d'une microflore d'un sol contaminé par l'As en vue de son inoculation dans un sol synthétique contaminé par du CCA**

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54-F		Nombres de pages : 9	
Version : 1/3		Date : 16.07.2002	
Auteur(s): <u>Simona Dobran</u>			
Approuvé par : <u>Gérald Zagury</u> <u>Louise Deschênes</u> <u>Lucie Jean</u>		Signatures : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	Date : _____ _____ _____

- Titre : Extraction d'une microflore d'un sol contaminé par l'As en vue de son inoculation dans un sol synthétique contaminé par du CCA.

Mots clés : extraction microflore d'un sol

## 1 OBJECTIF

Par l'application de ce protocole on vise à choisir une méthode d'extraction de la microflore d'un sol contaminé par As, Cu et Cr prélevé à la base d'un poteau traité par l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) en vue de son inoculation dans un sol synthétique contaminé par du CCA (voir le protocole P54-I).

## 2 THÉORIE

Dans le cadre de ce protocole il sera appliqué 2 méthodes d'extraction de la microflore, (en duplicata) selon Kingsley et Bohlool (1981), respectivement Jones *et al.*, (2000) en vue de choisir une méthode appropriée au niveau du rendement d'extraction de la microflore. Le principe de ces deux méthodes repose sur l'extraction de la microflore avec la même solution d'extraction, soit une mélange de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  et gélatine (Difco) hydrolysée 1% (p/v), et sur l'utilisation des agents flocculants qui facilitent la déposition des particules de sol colloïdales avec un diamètre  $< 1 \mu\text{m}$ .

## 3 MATÉRIEL

- Chambre froide à 4°C;
- Sol contaminé par As, Cr et Cu (prélevé à la base d'un poteau traité par du CCA) (voir protocole P54-E)
- Agitateur magnétique
- Agitateur rotatif (120 cycles/min)
- Agitateur Wrist action
- Centrifugeuse haute vitesse Beckmann, rotor J- 10
- Bouteilles à centrifuger Nalgene<sup>TM</sup> de 500 ml à couvercle vissable en PPCO(6)
- Bêcher de 1 l
- Bouteilles stérilisées (4)
- Cylindres gradués de 100 ml(4)
- Ballon volumétrique de 500 ml (1)
- Ballons volumétriques de 1000 ml (3)
- Unité filtrante stericap de 1 l
- pH-mètre Accumet AR25 , Fischer Scientific (préalablement calibré)
- Spatules
- Pipetes stériles jetables
- micropipette 5000 ul
- Bêchers de 5 ml (pour l'ajustement de pH)
- Contents stériles de 100 ml (4)
- Bouteille Pyrex autoclavable (1l ) (bouchon orange)

- Matériel nécessaire pour l'application du protocole A12 (méthode de décompte d'hétérotrophes totaux par la méthode NPP).

### 3 RÉACTIFS

- Eau déionisée
- NaOH 10 N
- Gélatine Difco
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,1 M
- Agents flocculants :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{MgCO}_3$
- Solutions nécessaires pour l'application des protocoles A12 (décompte d'hétérotrophes totaux par méthode NPP)

### 4 PRÉPARATIONS DES SOLUTIONS

*Note* : les solutions sont préparées en quantités supplémentaires au besoin de ce protocole, en vue de leurs utilisations dans le cadre du projet.

#### 4.1 Préparation d'une solution de gélatine (Difco) hydrolysée 1% (p/v)

1. Peser dans une coupelle de plastique à la balance environ 5,0000 g gélatine Difco. Noter le poids exact.
2. Transférer quantitativement dans un bêcher de 1 l.
3. Ajouter de l'eau deionisée jusqu'à 400 ml.
4. Ajouter un barreau magnétique et agiter sur une plaque magnétique.
5. A l'aide du ph-mètre, ajusté le pH de la solution à pH 10,3 avec une solution de NaOH 10 N.
6. Transférer quantitativement la solution dans un ballon de 500 ml.
7. Jauger avec de l'eau deionisée.
8. Transférer la solution dans une bouteille Pyrex autoclavable de 1 l et la boucher.
9. Autoclaver à  $121^\circ \text{C}$  pendant 20 min. la solution dans le but d'hydrolyser la gélatine.

#### 4.2 Préparation d'une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1 M stérile : ( M= 132 g/mol )

1. Peser 13,2000 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  dans une coupelle de plastique et transférer dans un ballon de 1l.
2. Ajouter de l'eau deionisée et jauger.
3. Filtrer la solution à l'aide d'une unité filtrante stericup de 1 l.
4. Répéter les étapes 1, 2,3, à deux reprises de manière à obtenir un volume total de 3 l de cette solution.

#### 4.3 Préparation de la solution d'extraction de la biomasse

1. À l'aide d'une pipette stérile jetable de 100 ml retirer 100 ml de la solution  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,1 M préparée dans un contenant stericup de 1 l et la jeter dans un bûcher à déchet.
2. Répéter l'étape 1 pour les deux autres solutions de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,1 M.
3. À l'aide d'une pipette stérile jetable de 100 ml, prélever 100 ml de la solution de gélatine 1% stérile et transférer dans la solution de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,1 M contenue dans la bouteille de 1 l.
4. Répéter l'étape 3 pour les deux autres contenants de la solution  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,1 M.
5. Boucher les trois bouteilles.

#### 4.5 Agents flocculents :

1.  $\text{Ca}(\text{OH})_2 : \text{MgCO}_3 = 2 : 5$  (Kingsley M. et Bohlool B. , 1981)

Peser dans une coupelle en plastique environ 0,20 g  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  et 0,50 g  $\text{MgCO}_3$  et mélanger les deux quantités dans une coupelle en plastique (les quantités sont nécessaires pour l'extraction de 10 g sol )

2.  $\text{CaCl}_2$  1% (Jones *et al.*, 2000)

Peser dans une coupelle en plastique environ 0,10 g  $\text{CaCl}_2$  pour l'extraction de 10 g sol .

## 5 MÉTHODOLOGIE

Pour l'extraction de la microflore, sera utilisé un sol contaminé par As, Cr et Cu échantillonné à la base d'un poteau à une profondeur de 0 à max.10 cm. Le sol sera tamisé à 2 mm et conservé à 4 degrés C dans des sacs en plastiques. Il est conseiller à faire l'extraction le plus vite possible. Le sol contaminé sera analysé pour les paramètres physico-chimiques et microbiologiques suivants : pH, concentration totale d'As, Cr et Cu, la teneur en matière organique (% solides volatiles) (protocole P33-A), le carbone organique dissous (COD) (protocole P54-C), la population d'hétérotrophes totaux par la méthode NPP (protocole A12). Aussi, après l'application de chaque méthode d'extraction procéder à un dénombrement d'hétérotrophes totaux (méthode NPP) dans la suspension microbienne.

### 5.1 Méthode d'extraction I (en duplicata) (selon Kingsley et Bohlool , 1981) :

1. Peser environ exactement 10,00 g sol contaminé dans un Erlenmeyer de 250 ml.
2. Sous la hotte biologique (pour préserver la stérilité de la solution mère d'extraction) ajouter avec un cylindre gradué de 100 ml, 95 ml de solution d'extraction.
3. Boucher l'Erlenmeyer avec un bouchon en caoutchouc et agiter pendant 5 min. sur l'agitateur Wrist action.

4. Ajouter, comme agent flocculant, 0,7 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2 : \text{MgCO}_3$  ( en proportion 2:5), soit 0,2 g  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  et 0,5 g  $\text{MgCO}_3$  et mélanger.
5. Transvaser la suspension dans un cylindre gradué de 100 ml et laisser reposer pendant 1 h pour la décantation des particules de sol.
6. Transférer le surnageant par décantation dans un contenant stérile de 100 ml .
7. Procéder à un dénombrement d'hétérotrophes totaux par la méthode NPP.

*Note 1* : Deux variantes de la methodes I ont été comparées en premier lieu : methode IA (avec un temps d'extraction de 5 min ) et la methode IB (avec un temps d'extraction de 30 min). Suite aux resultats des dénombrements des hétérotrophes totaux il a été choisi la methode I B pour la comparaison avec la methode II. Ainsi, en utilisant un temps d'extraction de 30 min (méthode IB) au lieu de 5 min.(méthode IA), le nombre de la population microbienne extraite, était plus élevée, soit  $1,8 \times 10^8$  (cellules /g sol) par rapport à la solution saline ( $\text{NaCl}$  0,85 % (p/v)) couramment utilisée en laboratoire ( $2,6 \times 10^7$  ). Pour une extraction de 5 min., le nombre de cellules extraites /g sol sec était de  $9,4 \times 10^6$  par rapport à la solution saline.

## **5.2 Méthode d'extraction II** (en duplicata) (selon Jones et al., 2000) :

1. Peser environ exactement 10,00 g sol contaminé dans un Erlenmeyer de 250 ml (en duplicata).
2. Sous la hotte biologique (pour préserver la stérilité de la solution mère d'extraction) ajouter 95 ml solution d'extraction dans l'Erlenmeyer, avec un cylindre gradué de 100 ml.
3. Boucher l'Erlenmeyer avec un bouchon en caoutchouc et agiter pendant 30 min sur l'agitateur rotatif (120 rpm).
4. Ajouter  $\text{CaCl}_2$  1% (0,10g) comme agent flocculant pour la clarification de la suspension.
5. Après la décantation des particules de sol, transférer le surnageant dans une bouteille à centrifugeuse de 500 ml.
6. Centrifuger la suspension pendant 10 min à  $5000 \times g$  (5200 rpm), (rotor JA-10).
7. Décanter le surnageant et la jeter.

*Note 2* : Apres l'enlèvement de la solution de phosphate et après la centrifugation, la méthode de Jones et al.(2000) utilisait pour redissoudre le culot (en vue d'enrichir la population capable de réduire l'As(V)) une solution des nutriments. Dans notre cas étant donné que le but n'était pas d'enrichir la population qui réduit l'As(V), on a choisi à redissoudre le culot de la microflore extraite dans un volume de 95 ml de solution saline 0,85 % (p/v). Le volume de 95 ml a été choisi en vue de comparer le rendement d'extraction de la méthode II avec la méthode d'extraction par la méthode I et par la solution saline.

8. Redissoudre immédiatement le culot (la microflore) dans 95 ml solution saline (0,85 % NaCl(p/v), en transvasant la solution saline dans une bouteille à centrifugeuse.

9. Procéder à un dénombrement des bactéries viables de la suspension microbienne un dénombrement des hétérotrophes totaux par la méthode NPP.

### Conclusions:

Suite à l'application de la méthode IB et II, la population microbienne extraite par la méthode II était inférieure à la méthode IB, soit égale à environ  $1,6 \times 10^6$  cellules/ml, mais similaire à la taille de la population extraite par la méthode IA (voir note I). Ainsi, la méthode d'extraction de la microflore du sol naturel choisie en vue de son inoculation dans les sols synthétiques contaminés par le CCA (selon le protocole P54-I) est la méthode IB, en ajoutant quelques étapes supplémentaires :

- transfert du surnageant obtenu après la décantation dans une bouteille à centrifugeuse ;
- centrifugation du surnageant pendant 10 min à  $5000 \times g$  (5200 rpm) ;
- redissolution du culot dans la solution saline NaCl (0,85 % (p/v)).

Ces étapes ont été ajoutées sachant que pour des concentrations molaires similaires d'une solution de phosphate et d'une solution contenant ions de chlorure, les ions de chlorure sont moins dommageables par rapport aux ions phosphate, concernant la mobilisation d'As dans le sol (Bhumbla et Keefer, 1994; Chen, 1994 ; Smith *et al.*, 2002). De plus, l'élimination de la solution d'extraction du phosphate était choisi, aussi, par Jones *et al.* (2000).

## 6 RÉFÉRENCE(S)

BHUMBLA, D.K. et KEEFER, R.F. (1994). Arsenic mobilisation and bioavailability in soils. In Arsenic in the environment, Part I: Cycling and Characterisation, J.O. Nriagu, ed., Wiley & Sons, New York, 51-82.

CHEN, T. (1994). Arsenate adsorption in soil and its mechanism. China Environmental Science, 5, No 1, 85-91.


JONES, C.A., LANGNER, H., ANDERSON, K., MCDERMOTT, T.R., et INSKEEP, W. (2000). Rates of microbially mediated arsenate reduction and solubilization, Soil Sci. Soc. Am. J., 64, 600-608.

KINGSLEY, M.T. et BOHLOOL, B. (1981). Release of Rhizobium spp. From Tropical soils and Recovery for Immunofluorescence Enumeration. Applied and Environmental Microbiology, 42, No 2, 241-246.

SMITH, E., NAIDU, R. et ALSTON, A.M. (2002). Chemistry of inorganic arsenic in soils: II. Effect of phosphorus, sodium, and calcium on arsenic sorption. Journal of Environmental Quality, 31, 557-563.



**P54-I: Dénombrement de la population microbienne hétérotrophe tolérante à l'arsenic dans un sol contaminé par le CCA, par la méthode de décompte sur boîtes de pétri.**

	<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54-I	Nombres de pages : 10	
Version : 1	Date : 3.06. 2002	
Auteur(s) : <u>Simona Dobran</u> _____ _____		
Approuvé par <u>Lucie Jean</u> <u>Gérald Zagury</u> <u>Louise Deschênes</u> _____	Signatures : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	Date : _____ _____ _____

- Titre : Dénombrement de la population microbienne hétérotrophe tolérante à l'arsenic dans un sol contaminé par le CCA, par la méthode de décompte sur boîtes de pétri.

Mots clés : arsenic, dénombrement sélectif, microflore tolérante à l'arsenic

## 1 OBJECTIF

Cette méthode vise à déterminer le nombre de microorganismes hétérotrophes qui peuvent croître en présence de l'arsenic(V) dans un sol contaminé par l'arséniate de cuivre chromaté (CCA). Ce protocole sera appliqué tout au long de la période des essais en macrocosmes (protocole P54-I), en vue de suivre l'évolution de la population microbienne hétérotrophe qui développe une résistance à l'As(V). Ainsi, on pourra déterminer si la croissance d'une population microbienne hétérotrophe a une influence sur la réduction biotique de l'As (V) en As (III).

## 2 PRINCIPE

Le principe de la méthode consiste à faire des dilutions en série de l'échantillon de sol contaminé artificiellement par la solution de CCA et d'étaler un volume connu de l'échantillon dilué sur une boîte de Pétri contenant un milieu sélectif gélifié. Le milieu sélectif gélifié est composé de :

- 27,5 g/l du Trypticase Soy Broth sans dextrose (digestion pancréatique de caséine ,17 g, peptone de soya 3 g/l, chlorure de sodium 5 g/l, phosphate dipotassique 2,5 g)
- 100 ml/l d'une solution d'oxyde d'arsenic hydraté  $\text{As}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  (50 mg/l As(V))
- 15 g/l d'agar purifié

Après une période d'incubation aérobie des boîtes de Pétri, pendant 10 jours à la noirceur, et à la température ambiante, la microflore développée en présence de l'As(V) sera estimée par la méthode de décompte sur boîte de Pétri à l'aide d'un compteur manuel en terme de nombre d'UFC (unités formant de colonies) par gramme de sol. (Turpeinen *et al.*, 1999)

*Note :* Trois boîtes de Pétri seront analysées par Philip pour déterminer les teneurs en As total en mg/kg de milieu gélosé.

## 3 MATÉRIELS

*Note: Tout le matériel est calculé pour 18 échantillons de sol et 4 dilutions dans le tubes S'il est besoin, après la première série de dénombrement, augmenter le nombre de dilutions.*

- Boîtes de Pétri (pour 18 échantillons on aura besoin de 12 boîtes de Pétri par échantillon, soit 4 dilutions en triplicata) (216)
- Boîtes de Pétri afin de servir de contrôles (2)
- Tubes à dilution de 15 ml pré- identifiés (3 tubes par échantillon) ( 54)
- Bouteilles contenant 95 ml de solution saline (NaCl 0,85 %) stérilisée (18)

- Erlenmeyers de 2 l (il faut prévoir un Erlenmeyer plus grande que la quantité de milieu à préparer, étant donné qu'il peut être rempli jusqu'à 1,7 l pour pouvoir être autoclavé de façon sécuritaire);
- Ballon de 1000 ml
- Unité filtrante de 0,45 um
- Pipetman P200 ul , P1000 ul
- Pipette stérile de 100 ml
- Embouts micropipettes stériles (autoclavés)
- Agitateur magnétique;
- Poire;
- Billes en verre;
- Spatule;
- Papier autoclavage;
- Seringue (50 ml) + filtre de stérilisation (0,45um) ;
- Bouchons en mousse et papier en aluminium ;
- Tige en verre recourbée sous forme de bâton de hockey;
- Pétri en verre avec couvercle contenant environ 30 ml d'éthanol 95 %
- Dispensette de 100 ml
- pH-mètre calibré
- Balance (précision 0,01 g);
- Autoclave ;
- Flamme pour la stérilisation ;
- Bain- marie;
- Hotte biologique;

#### 4 RÉACTIFS

- Trypicase soy Broth sans dextrose ( pr.no. 286220, Difco)
- Na Cl 0,85 % ( p/v);
- Agar purifié;
- HCl 5 M;
- NaOH 5M;
- Acide nitrique 10 % (v/v);
- Oxyde d'arsenic hydraté  $As_2O_5 \cdot 3 H_2O$
- Alcool dénaturé (éthanol 85 %) ;
- Eau distillée;
- Eau deionisée;
- Eau stérilisée (autoclavée);

## 5 MÉTHODOLOGIE

### ➤ Préparation de la solution As (V) 500 mg/l

*Recommandations : Étant donné que l'oxyde d'arsenic hydraté est une substance très toxique, éviter la dispersion de poussières et faire toutes les manipulations protégées par des lunettes de protection et masque antipoussière !*

1. À la balance, dans une coupelle de plastique peser 0,94 g d'oxyde d'arsenic hydraté ( $\text{MAs}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} = 284 \text{ g/mol}$ ) et transférer quantitativement dans un ballon de 1000 mL ;

#### **Calcul :**

La quantité d'oxyde d'arsenic hydraté qui contient 500 mg As (V) dans 1 l de solution est la suivante :

$$m \text{As}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} = 284 \times 0,500 / 150 = 0,94 \text{ g}$$

$$M \text{As}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} = 284 \text{ g/mol}$$

$$M \text{As} = 75 \text{ g/mol}$$

2. Ajouter de l'eau deionisée et mélanger;
3. Jauger avec de l'eau deionisée ;
4. Transférer la solution d'arséniate de sodium dans une unité filtrante (0,22 um) de 1l;
5. Filtrer la solution d'arséniate en reliant un tube à la valve à succion.
6. Sous la hotte biologique dévisser la partie supérieure de l'unité filtrante et boucher la bouteille.

### ➤ Préparation du milieu sélectif

1. À la balance, dans une coupelle de plastique, peser 27,5 g de Trypticase Soy Broth sans dextrose et transférer dans un Erlenmeyer de 2 l.
2. À la balance, dans une coupelle de plastique, peser 15 g d'agar purifié et transférer dans le même Erlenmeyer de 2L ;
3. Ajouter avec un cylindre, 900 ml de l'eau distillée.  
(Pour préparer 218 boîtes de Pétri il faut 4360 ml de milieu de culture, soit 218 x 20 ml).
4. Répéter les étapes 1,2, et 3 à quatre reprises pour avoir 5 Erlenmeyers de 2 l.
5. Fermer les Erlenmeyers à l'aide des bouchons de mousse et couvrir le col de papier d'aluminium.
6. Poser un papier autoclavé dessus et mettre à autoclaver au moins 30 min. à une température de 121° C.
7. Mettre les Erlenmeyers dans un bain marie pendant 30 min. afin de maintenir sa température à 60 ° C.
8. Mettre la solution d'oxyde d'arsenic hydraté de 500 mg/l dans le bain à 60 ° C pendant 30 min.

9. Prendre un Erlenmeyer de 2 l contenant le milieu de culture sous la hotte et retirer le bouchon mousse.
10. Mettre la solution d'oxyde d'arsenic hydraté de 500 mg/l stérile sous la hotte et à l'aide d'une pipette stérile de 100 ml, prélever 100 ml de cette solution et transférer dans l'Erlenmeyer de 2L.( pour obtenir une concentration finale de 50 mg/l d'As du milieu sélectif )

### Calcul

Nombre d'équiv.gram de la solution d'arsenic de 500 mg/l =  $500 / 74,92/2 = 13,34 \text{ N}$

Nombre d'équiv.gram d'arsenic du milieu de culture de 50 mg/l As(V) =  $50/74,92/2 = 1,33 \text{ N}$

(MA<sub>As</sub>=74,92 g/mol)

$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$

$13,34 \times X = 1,33 \times 1000\text{ml}$

$X = 100 \text{ ml}$  solution d'arsenic 500 mg/l

11. Répéter les étapes 9 et 10 pour les autres 4 Erlenmeyers.
12. Dans un petit bêcher de 10 ml, transvider un peu de milieu de culture afin de mesurer le pH à l'aide d'un pH-mètre.
13. Passer le goulot à la flamme, mettre le bouchon mousse.
14. Mélanger en agitant légèrement.
15. Ajuster le pH avec une solution de HCl 5M (ou une solution basique de NaOH 5M) pour obtenir un pH du milieu de 6,5.
16. Passer le col à la flamme, mettre le bouchon de mousse et incuber les Erlenmeyers à 60 ° C.

Attention : le milieu de culture ne doit pas rester trop longtemps sous la hotte, car il va figer.

### ➤ Procédure de distribution du milieu de culture sur boîtes de Pétri

*Travailler en conditions stériles – passer le goulot des bouteilles à la flamme après ouverture et avant fermeture. Procéder à l'inoculation des boîtes de Pétri en demeurant à proximité du rayon d'influence de la flamme.*

1. Distribuer environ 20 ml du milieu préparé (TSB + oxyde d'arsenic hydraté) dans la boîte de Pétri, en essayant de ne pas l'ouvrir complètement. Refermer la boîte et la garder sur le comptoir stérilisé. Procéder de même façon pour les autres boîtes de pétri. Empiler jusqu'à 5 boîtes de Pétri.
2. Laisser l'agar se solidifier à température de la pièce pendant 1 heure sous la hotte ventilée.

4. Après la solidification de l'agar, les boîtes de Pétri seront placées en position inverse dans un sac et entreposer à 4 degrés C.

➤ **Préparation des bouteilles à dilution  $10^{-1}$  et des tubes à dilution  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$**

1. Préparer 3 l de la solution saline de NaCl 0,85 % p/v (8,5 g NaCl dans 1 l d'eau distillée ) nécessaires pour la préparation des tubes à dilution (environ 1 l) et pour les bouteilles à dilutions  $10^0$  ( environ 2 l ).
2. Distribuer 95 ml dans chaque 18 bouteilles de 150 ml (dilution  $10^0$ ) et 9 ml dans chacun de 54 tubes à dilutions à l'aide d'une dispensette. Placer 30 billes de verre dans les bouteilles à dilution  $10^0$ .
3. Boucher les tubes et les bouteilles en vissant les bouchons au  $\frac{3}{4}$  de tour.
4. Autoclaver à  $121^\circ\text{C}$  pendant 20 min., puis laisser refroidir.
5. Suite à l'autoclavage numéroté les tubes et les bouteilles de 150 ml avec le n° de dilution approprié pour chaque échantillon de sol.

➤ **Préparation des dilutions en série**

(toujours dans des conditions stériles près de la flamme sous la hotte biologique ventilée) (voir le schéma procédural)

1. Peser environ 10 g de sol contaminé par le CCA (noter le poids exact) à l'aide d'une spatule stérilisée dans une bouteille à dilution  $10^0$  préalablement autoclavée contenant 95 ml de solution saline 8,5 g NaCl / l % et 30 billes de verre.
2. Faire parallèlement un poids sec (PSO A7) en duplicata pour chacun des sols.
3. Agiter sur Wrist action la bouteille  $10^0$  pendant 30 min.
4. Avec une micropipette stérile de 1000  $\mu\text{l}$ , transférer 1 ml de la bouteille à dilution  $10^0$  au premier tube à dilution  $10^{-1}$  et agiter vigoureusement.
5. Avec un nouvel embout, transférer 1 ml du tube de dilution  $10^{-1}$  au deuxième tube de dilution  $10^{-2}$  et agiter vigoureusement.
6. Procéder ainsi de suite jusqu'au tube à dilution  $10^{-3}$ . (Voir schéma procédural).

➤ **Étalements sur boîtes de Pétri**

(Toujours dans des conditions stériles près de la flamme sous la hotte biologique ventilée)

1. Identifier les boîtes de pétri  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ .
2. Agiter vigoureusement la bouteille  $10^0$  et avec un pipetman P200 transférer 0,1 ml de la bouteille dans chacune des 3 boîtes de pétri identifiés  $10^{-1}$ .
3. Prenez la tige de verre recourbée et la stériliser en la trempant dans l'alcool 95 %, puis en la passant à la flamme. Attendre quelques secondes afin que la tige se refroidisse. Ensuite procéder à l'étalement de l'inoculum sur la boîte de Pétri par mouvements circulaires de la tige sur la surface de la boîte de Pétri.
4. Suite à l'étalement sur Pétri, remettre le couvercle et inverser le Pétri.

5. Agiter vigoureusement le tube identifié  $10^{-1}$  et avec un nouvel embout transférer 0,1 ml du tube sur les 3 boîtes de Pétri identifiées  $10^{-2}$ .
6. Refaire les étapes 3 et 4.
7. Refaire les étapes 5, 6, pour les tubes à dilution  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ .
8. Inoculer 2 boîtes de Pétri avec 0,1 ml d'eau saline stérile 0,85 % p/v afin de servir de contrôles.
9. Incuber toutes les boîtes de Pétri en conditions aérobies à la température de la pièce pendant 10 jours à la noirceur. (Turpeinen et al., 1999)

### ➤ Comptage des colonies

Après 10 jours d'incubation seulement les boîtes de Pétri contenant entre 30 –300 colonies seront prises en considération pour le comptage. Les boîtes de Pétri contenant de la contamination sont exclues du compte final. Le comptage se fait manuellement à l'aide du compteur Québec.

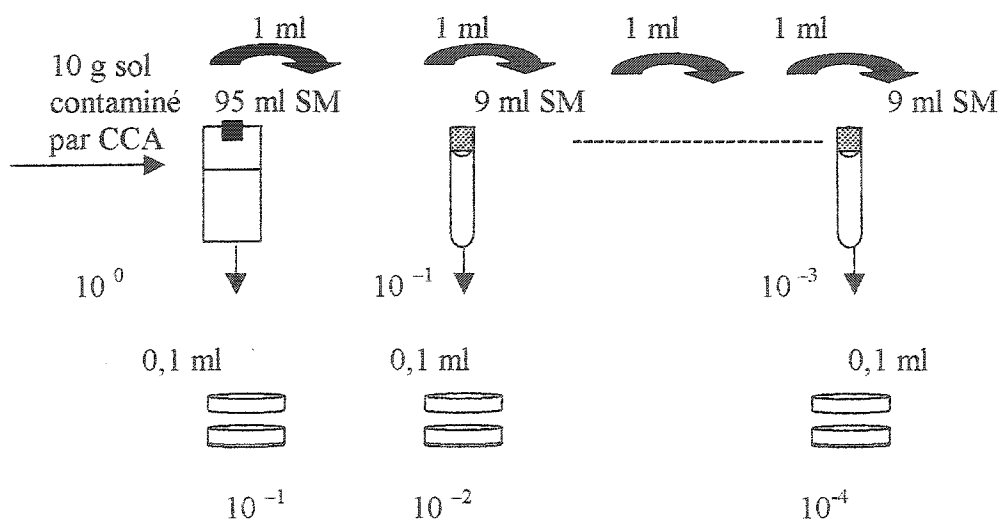
### ➤ Calculs

Pour chacun des triplicatas, calculer le nombre de UFC/g résidu sec. Effectuer une moyenne et un écart type sur les trois résultats. La détermination du nombre de u.f.c. (unités formant des colonies par gramme) se calcule comme suit :

$$\text{Nombre de u.f.c. g}^{-1} = \frac{(\text{compte moyen de la dilution}) (\text{facteur de dilution})}{\text{Poids sec du sol}}$$

$$\text{Poids sec du sol} = \text{poids humide} \times (1 - \% \text{ humidité} / 100)$$

### SCHÉMA PROCEDURAL




## 6 RÉFÉRENCE(S)

ESTRELA, S. (1996) PSO A4: Dénombrement total de colonies bactériennes hétérotrophes par la méthode du comptage sur boîtes de Pétri ou méthode des comptes viables.

TURPEINEN, R., PANTSAR-KALLIO, M., HAGGBLOM, M. et KAIRESALO, T. (1999). Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biometylation of arsenic in soil. The Science of the Total Environment, 236, 173-180.



**P54-J: Évaluation de l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) sur la spéciation de l'arsenic. Essais en macrocosmes.**

	<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : P54-J	Nombres de pages : 11	
Version : 1	Date : 2.07.2002	
Auteur(s) : <u>Simona Dobran</u> _____		
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u>	Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/>	
<u>Gérald Zagury</u>	_____ <input type="checkbox"/>	
<u>Louise Deschênes</u>	_____ <input type="checkbox"/>	

Titre : Évaluation de l'influence de la teneur en matière organique d'un sol contaminé par l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) sur la spéciation de l'arsenic. Essais en macrocosmes.
Mots clés : spéciation, arsenic, minéralisation de la matière organique

## 1 OBJECTIF

Suite à l'application de ce protocole, le rôle de la teneur en matière organique, sur le changement de la spéciation de l'arsenic dans un sol synthétique contaminé par le CCA, sera évalué en conditions aérobies.

Ainsi, les objectifs principaux du protocole sont les suivants :

- Évaluer si la teneur en matière organique d'un sol, en conditions biotiques (en présence d'une microflore inoculée), influence la réduction d'As (V) et la méthylation de l'arsenic dans un sol contaminé par le CCA, en conditions aérobies. De plus, il sera déterminé si la croissance d'une population microbienne mixte tolérante à l'As(V) influence la réduction biotique de l'As (V) en As(III) dans le sol.
- Évaluer si la teneur en matière organique d'un sol, en conditions abiotiques (sans inoculation) influence la spéciation de l'As (V) dans les sols contaminés par le CCA en conditions aérobies.

## 2 MATÉRIELS ET RÉACTIFS

- Macrocosmes (réacteurs en verre) de 1,1 litre stérilisés, (d=10 cm, L=17,5 cm) (20)
- Couvercles (20)
- Acide nitrique 10 %(v/v)
- Spatules en téflon lavées à l'acide et stérilisées (20)
- Pipettes stériles, 25 ml
- Seringues de plastique, 30 ml (20 échantillons +1 blanc) (20)
- Filtres de nylon 0,45  $\mu$ m (Millipore) (21)
- Bouteille Pyrex stérilisée, 500 ml
- Eau distillée stérilisée
- Solution saline stérile
- Sacs Whirlpack
- Touts les matériels et réactifs pour l'application de protocoles P54-A, P35-E et P35-H

## 3 MÉTHODOLOGIE

L'étude de l'influence de la matière organique sur la spéciation de l'arsenic en conditions aérobies, sera réalisée en suivant les changements des certains paramètres chimiques et microbiologiques des 4 sols synthétiques contaminés par du CCA (sols A-D), pendant une période d'incubation de 40 jours. Ainsi, à des intervalles établis (selon le tableau C4) il sera déterminé, si les concentrations des formes chimiques de l'arsenic,

soient l'As(III), As(V), MMAA(acide d'arsenic monométhylée) et DMAA (acide d'arsenic diméthylée) dans la fraction soluble (extraits aqueux) et l'As(III), As(V) dans le sol, changent pendant le temps, en présence d'une quantité variable de matière organique. De plus, il sera analyser la variation des certains paramètres étroitement liés à la consommation de la matière organique d'un sol, tels que le COD (carbone organique dissous), le nombre d'hétérotrophes totaux et d'hétérotrophes tolérants à l'arsenic.

Les essais en macrocosmes seront réalisés sur 20 échantillons de sols contaminés artificiellement par le CCA (4 sols x 5 macrocosmes). Ainsi, pour chaque type de sol, A-F, il sera préparé 5 macrocosmes, dont 3 échantillons inoculés et 2 échantillons non inoculés.

#### **Préparation des sols à l'étude et essais en macrocosmes**

1. Constituer 4 sols synthétiques A, B, C, D (environ 1,8 kg de chaque sol) et contaminer par du CCA, à un pH d'environ 7, selon les protocoles P54-A, P35-E et P35-H.

2. Déterminer les paramètres physico-chimiques des sols non contaminés et contaminés selon le tableau 4.1. Déterminer le contenu en eau des sols avant l'étape 4.

3. Faire tremper 20 réacteurs en verre de 1,1 l dans l'acide nitrique 10 %(v/v) pendant 24 h. Rincer avec de l'eau distillée et deionisée et stériliser à l'autoclave avant utilisation.

4. Peser dans des sacs en plastique Whirlpack, 5 x 260,00 g de chaque sol sec et, aussi, séparément, 100 g sol humide nécessaire pour les analyses après la stérilisation.

*Note :* Noter le poids humide du sol de chaque microcosme (les poids humides devront correspondre à 260 g sol sec)

5. Envoyer les sols à la stérilisation par la radiation gamma à 50kGy (*Wolf et al., 1989*) au MDS, Nordion.

6. Après la stérilisation vérifier le pH et déterminer la capacité de rétention d'eau au champ (CRC) selon protocole psoA23 des sols stérilisés (prélevés du sac contenant 100 g sol).

7. Vérifier l'efficacité de la stérilisation par un dénombrement des hétérotrophes totaux des sols stérilisés prélevés du sac contenant 100 g sol.

8. Dans des conditions stériles, sous la hotte microbiologique, transférer les quantités de 260 g sol sec stérilisées pré-pesées dans les microcosmes préalablement identifiés.

9. Ajuster pour tous les échantillons des sols, une partie de l'humidité, avec un volume V1 d'eau distillée stérile :

$$V1 = V_{\text{liquide nécessaire pour ajuster l'humidité à 80 \% CRE}} - 13 \text{ ml,} \quad (\text{ml})$$

*Note :*

-13 ml, représente le volume de la suspension microbienne (redissoute dans une solution saline NaCl 0,85 % (p/v)) à inoculer dans les 3 échantillons de chaque sol (A1,2,3 – D1,2,3).

10. Homogénéiser les sols de la même manière, à l'aide d'une spatule en téflon.

*Note :* Entre chaque macrocosme, utiliser une spatule en téflon stérile (trempé la spatule dans l'éthanol 70% et sécher ou faire stériliser la spatule à l'autoclave).

11. Équilibrer les sols pendant 24 h à la température de la pièce et à la noirceur.

12. Toujours en conditions stériles, inoculer les échantillons A1,2,3-D1,2,3 avec 13 ml de la suspension microbienne à l'aide d'une pipette stérile de 25 ml extraite la même journée.

*Note :* Pour inoculer une quantité de 12 x 260 g de sols se (A-D), soit 3120 g sol sec, il est nécessaire d'avoir un volume de 156 ml d'une suspension microbienne. Ce volume sera extrait à partir de 5 extractions de sol, soit 50 g sol naturel contaminé par le CCA. Après l'extraction et la re-suspension de la microflore sous la forme de culot ( voir protocole P54-F), dans un volume de 35 ml de la solution saline stérile, mélanger les 5 volumes de 35 ml de la biomasse dans une bouteille Pyrex stérilisée. Bien homogénéiser la suspension, avant chaque prélèvement d'inoculum.

12. Sous la hotte microbiologique, ajouter à l'aide d'une pipette stérile, 13 ml de solution saline stérilisée NaCl (0,85 % (p/v)) aux échantillons non inoculés.

13. Bien homogénéiser les sols inoculés et non inoculés, avec des spatules stériles.

14. Recouvrir les microcosmes et incubé à la noirceur, à la température de la pièce.

15. Analyser les paramètres physico-chimiques et microbiologiques des sols artificiels contaminés par le CCA, selon le tableau C4, à  $t=t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_f$ , soit après 1, 5, 15, et 40 jours d'incubation.

*Note :* À chaque temps d'échantillonnage prélever de chaque macrocosme, dans des pots en verre, la quantité nécessaire pour les analyses physico-chimiques et séparément dans des pots stérilisés la quantité nécessaire pour les analyses microbiologiques. Conserver les échantillons de sol à 4 degrés C jusqu'aux analyses.

**Recommandations :**

1. Pour assurer l'aération des macrocosmes, ouvrir les macrocosmes à chaque deux jours, et aérer pendant 10 min (Bernal *et al.*, 1998) sous la hotte microbiologique, en conditions stériles.
2. Avant chaque échantillonnage, mélanger le sol avec une spatule stérile (en téflon trempée dans l'éthanol 70 % et séchée, ou stérilisée à l'autoclave). L'homogénéisation de sols doit se faire de la même manière, pour que les conditions soient uniformes.
3. Vérifier la perte d'humidité du sol de chaque microcosme en faisant le poids sec tout au long des essais. Ainsi, si une diminution de plus de 4 % est observée ajuster l'humidité des sols avec de l'eau distillée stérilisée.
4. À chaque échantillonnage des sols inoculés, pour les décomptes d'hétérotrophes totaux et tolérants, enlever la même quantité du sol nécessaire pour les analyses de chaque échantillon de sol non inoculé pour assurer l'uniformité des conditions dans les microcosmes.
5. Pour vérifier que les conditions dans les microcosmes A4,5-D4,5 sont non-abiotiques tout au long des essais, effectuer des décomptes d'hétérotrophes totaux sur les sols non inoculés A4,5-D 4,5 à chaque temps d'échantillonnage.

# FEUILLE DE TRAVAIL

Tableau C4 Suivi des paramètres physico-chimiques et microbiologiques des sols synthétiques (A-D) contaminés par du CCA, avant et pendant les essais en macrocosmes.

Paramètres	Protocole appliqué	Avant la contamination des sols	Après la contamination des sols	Après la stérilisation des sols	t= t 0	t= t1	t= t2	t= tf	Nomenclature des macrocosmes
pH	P35-F (2/2)	X (triplicata)	X (triplicata)	X (duplicata)	X	X	X	X	Al-Di
Ajustement de pH	P35-G	X (s'il est nécessaire)	X (s'il est nécessaire)	-	-	-	-	-	-
Solides volatiles (%)	P33-A	-	X (duplicata)	X (duplicata)	-	-	-	-	Al-Di
COD (ug/g)	P34-C	-	X (duplicata)	-	X	X	X	X	Al-Di
COT (g/kg)	Philips Analytiques	-	-	-	X	-	-	X	Al-Di
CT (g/kg)	École Polytechnique	-	-	-	X	-	-	-	Al-Di

Paramètres	Protocole appliqué	Avant la contamination des sols	Après la contamination des sols	Après la stérilisation des sols	t=t <sub>0</sub>	t=t <sub>1</sub>	t=t <sub>2</sub>	t=t <sub>f</sub>	Nomenclature des macrocosmes
TKN (g/kg)	Philips Analytiques	-	-	-	X	-	-	-	Ai-Di
CRE (%)	PSO-A23	-	-	X (triplicate)	-	-	-	-	Ai-Di
Poids sec (%)	PA7	X (duplicate)	X (triplicate)	-	X	X	X	X	Ai-Di
As, Cu, Cr total (sol) (mg/kg)	PE-32 D (2/2) PE- 32 F	X (triplicate)	X (triplicate)	-	X	-	-	X	Ai-Di
AsI, As(V), As(III) (digestats du sol) (mg/kg)	PSO-A19	-	-	-	X	X	X	X	Ai-Di

Paramètres	Protocole appliqué	Avant la contamination des sols	Après la contamination des sols	Après la stérilisation des sols	t=t <sub>0</sub>	t=t <sub>1</sub>	t=t <sub>2</sub>	t=t <sub>f</sub>	Nomenclature des macrocosmes
Ast, Cu, Cr, As(V), As(III), MMAA, DMMA (extrait de l'eau) (mg /kg)	Annexe A et CEAEQ	-	-	-	X	X	X	X	AI-Di
Hétérotrophes totaux (u.f.c /g sol)	P/A4	-	-	X (AI-Di)	X	X	X	X	AI-Di
Hétérotrophes tolérants à As (u.f.c /g sol)	P54-I	-	-	-	X	X	X	X	AI 2,3-DI 2,3
Quantité min de sol requise( A-F) (poids humide)	-	50	150	100	70	60	60	70	260

# 1. Nomenclature des échantillons:

AI-Di; i=1-5 AI, 2, 3 -DI, 2, 3; échantillons inoculés  
A 4, 5 -D 4, 5; échantillons non-inoculés



## ANNEXE A

### Extraction de l'arsenic, chrome et cuivre dans l'eau deionisée.

1. Tremper à l'acide nitrique, 10 %(v/v), 21 tubes à centrifugeuse de 40 ml (21 échantillons + un blanc) pendant 24 h. Rincer avec de l'eau distillée et deionisée avant utilisation.
2. Peser environ exactement 4,00 g sol humide dans le tube à centrifugeuse.
3. Ajouter avec une pipette, 32 ml d'eau deionisée.
4. Poser le tube à centrifugeuse sur l'agitateur Wrist action, fixé à la vitesse 10 (PE-32D), et agiter pendant 2 h.
5. Centrifuger la suspension à  $10.000 \times g$  pendant 15 min.
6. À l'aide d'une seringue de plastique de 30 ml, filtrer le surnageant sur un filtre de nylon de 0,45  $\mu m$  (Millipore) directement dans les tubes en polypropylène (Pongratz, 1998).
7. Garder les surnageants filtrés à  $4^{\circ} C$  (Bissen et Frimmel, 2000 ), jusqu'à l'analyse de l'As total par ICP-MS (10 ml) et la spéciation de l'arsenic par HPLC- IC-MS par le laboratoire de CEAEQ (10 ml ).
8. L'analyse du chrome et cuivre dans l'extrait sera effectuée chez Philips Analytiques, par la méthode ICP-AES (10 ml).
9. Aviser le CEAEQ et Philips que les échantillons doivent être conservés à  $4^{\circ} C$  avant l'analyse.

#### 4 RÉFÉRENCE(S)

BERNAL, M.P., MONEDERO, S.M.A., PAREDES, C. et ROIG, A. (1998). Carbon mineralisation from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. Agriculture Ecosystems and Environment, 69, 175-189.

BISSEN, M. et FRIMMEL, F.H. (2000). Speciation of As(III), As(V), MMA et DMA in contaminated soil extracts by HPLC-ICP-MS. Fresenius J. Anal. Chem., 367, 51-55.

PONGRATZ, R. (1998). Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil. The Science of the Total Environment, 224, 133-140.

TURPEINEN, R., PANTSAR-KALLIO, M., HAGGBLOM, M. et KAIRESALO, T. (1999). Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biometylation of arsenic in soil. The Science of the Total Environment, 236, 173-180.

WOLF, D.C., DAO., T.H., SCOTT, H.D. et LAVY, T.L. (1989). Influence of sterilisation methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. Journal of Environmental Quality, 18, 39-44.

**ANNEXE D : Résultats expérimentaux**

## Contamination des sols synthétiques par une solution commerciale de CCA de type C

**Tableau D1 Concentrations de métaux dans les surnageants (mg/l) en fonction du temps et la quantité de métaux retenus dans les sols (mg/kg sol sec) après la période de repos de 5 jours**

Sol	Temps (h)	C <sub>As</sub> (mg/l)	As retenu <sup>a</sup> (mg/kg sol sec) (après 5 jours)	C <sub>Cu</sub> (mg/l)	Cu retenu <sup>a</sup> (mg/kg sol sec) (après 5 jours)	C <sub>Cr</sub> (mg/l)	Cr retenu <sup>a</sup> (mg/kg sol sec) (après 5 jours)
A	4	240	-	220	-	640	-
	24	270	-	230	-	640	-
	48	240	-	220	-	620	-
	120	200	647	180	327	610	42
B	4	360	-	3,4	-	450	-
	24	360	-	3,4	-	420	-
	48	390	-	3,4	-	460	-
	120	300	480	3	622	320	525
C	4	330	-	2,3	-	270	-
	24	330	-	2,3	-	260	-
	48	310	-	2,4	-	270	-
	120	260	547	1,8	624	180	758
D	4	300	-	2	-	130	-
	24	300	-	2,1	-	110	-
	48	270	-	1,8	-	110	-
	120	270	530	1,9	624	53	970

Concentrations de métaux de la solution de CCA-C appliquées aux sols (C<sub>i</sub>): 588 mg As/l, 376 mg Cu/l, 635 mg Cr/l (m<sub>sol sec</sub> = 150 g ; taux sol : solution = 1; 1,66)

Concentrations théoriques de métaux dans les sols: 980 mg As /kg sol sec, 627 mg Cu/kg sol sec, 1058 mg Cr /kg sol sec.

<sup>a</sup> calculé comme  $(C_i - C) \times V_{\text{solution}} / m_{\text{sol sec}}$  (mg élément retenu /kg sol sec)

où,

C<sub>i</sub>: concentration d'élément appliquée au sol, mg/l

C: concentration d'élément dans le surnageant mesurée à la fin de la période de contamination (au jour 5 de repos), mg/l

V<sub>solution</sub> = 0,25 l

M<sub>sol sec</sub> = 0,150 kg

## Spéciation de l'As dans les sols en fonction du temps

**Tableau D2 Spéciation de l'As dans les sols au jour 1 d'incubation**

Sol	As <sub>t</sub> mesuré (mg/kg)	As (V) (mg/kg)	As(III) back- wash (mg/kg)	Bilan de masse <sup>e</sup>
A(I) <sup>a</sup>	580 ± 43	655 ± 41	24 ± 6	117 ± 0,2
A(NI) <sup>b</sup>	652 ± 11 (50)	726 ± 8 (44)	30 <sup>d</sup>	116
B(I) <sup>a</sup>	581 ± 38	594 ± 63	68 ± 20	114 ± 0,3
B(NI) <sup>b</sup>	540 ± 9 (17)	614 ± 5 (23)	41 ± 5 (2)	121 ± 0,1
C(I) <sup>a</sup>	532 ± 37	665 ± 59	38 ± 7	132 ± 0,2
C(NI) <sup>b</sup>	585 ± 15 (63)	668 ± 10 (49)	48 ± 13 (4)	122 ± 0,2
D(I) <sup>a</sup>	590 ± 2	673 ± 54	50 ± 1	122 ± 0,1
D(NI) <sup>c</sup>	629	678	61	117

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)

<sup>b</sup> : moyenne ± RPD % (n=2). Les écarts type sont dans les parenthèses.

<sup>c, d</sup> : un réplicat

<sup>e</sup> : bilan de masse = (As (V) + As(III) back-wash)\*100/As total mesuré)

**Tableau D3 Spéciation de l'As dans les sols au jour 5 d'incubation**

Sol	As <sub>t</sub> mesuré (mg/kg)	As (V) (mg/kg)	As(III) back-wash (mg/kg)	Bilan de masse <sup>d</sup>
A(I) <sup>a</sup>	544± 31	680 ± 26	12 ± 4	127 ± 0,3
A(NI) <sup>b</sup>	562 ± 9 (35)	679 ± 6 (30)	19 ± 20 (3)	124± 0,2
7(I) <sup>a</sup>	583 ± 18	676 ± 62	52 ± 1	124 ± 0,1
B(NI) <sup>b</sup>	493 ± 3 (10)	535 ± 25 (96)	36 ± 47 (12)	115 ± 0,4
C(I) <sup>a</sup>	584± 82	620± 57	52 ± 32	115± 0,6
C(NI) <sup>b</sup>	577± 14 (60)	572± 20 (82)	38 ± 37 (10)	105 ± 0,3
D(I) <sup>a</sup>	625± 51	682± 8	56 ± 17	118± 0,3
D(NI) <sup>c</sup>	594	582	46	106

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)<sup>b</sup> : moyenne ± RPD % (n=2). Les écarts type sont dans les parenthèses<sup>c</sup> : un réplicat<sup>d</sup> : bilan de masse = (As (V) +As(III) back-wash)\*100/As total mesuré)

**Tableau D4 Spéciation de l'As dans les sols au jour 15 d'incubation**

Sol	As <sub>i</sub> mesuré (mg/kg)	As (V) (mg/kg)	As(III) back- wash (mg/kg)	Bilan de masse <sup>c</sup>
A(I) <sup>a</sup>	702 ± 221	698 ± 81	7 ± 3 <sup>d</sup>	100 ± 0,5
A(NI) <sup>b</sup>	576 ± 16 (64)	608 ± 5 (23)	< LDR	105 ± 0,1
B(I) <sup>a</sup>	572 ± 43	673 ± 95	37 ± 6	124 ± 0,2
B(NI) <sup>b</sup>	555 ± 8 (32)	722 ± 12 (60)	28 ± 42 (8)	135 ± 0,3
C(I) <sup>a</sup>	539 ± 29	538 ± 42	32 ± 8	105 ± 0,2
C(NI) <sup>b</sup>	538 ± 6 (20)	514 ± 11 (39)	38 ± 25 (7)	102 ± 0,2
D(I) <sup>a</sup>	581 ± 11	508 ± 31	65 ± 3	98 ± 0,1
D(NI) <sup>c</sup>	657	608	97	107

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)<sup>b</sup> : moyenne ± RPD % (n=2). Les écarts type sont dans les parenthèses.<sup>c</sup> : un réplicat<sup>d</sup> : 2 valeurs sur 3 étaient < LDR (1 ug/l)<sup>e</sup> : bilan de masse = (As (V) + As(III) back-wash)\*100/As total mesuré)

**Tableau D5 Spéciation de l'As dans les sols au jour 40 d'incubation**

Sol	As <sub>t</sub> mesuré (mg/kg)	As (V) (mg/kg)	As(III) back- wash (mg/kg)	Bilan de masse <sup>d</sup>
A(I) <sup>a</sup>	632 ± 38	706 ± 42	10 ± 0	113 ± 0,1
A(NI) <sup>b</sup>	697 ± 12 (57)	815 ± 20 (113)	10 ± 4 (0,3)	118 ± 0,2
B(I) <sup>a</sup>	676 ± 62	690 ± 16	32 ± 1	106 ± 0,1
B(NI) <sup>b</sup>	552 ± 8 (17)	635 ± 4 (18)	34 ± 23 (6)	121 ± 0,2
C(I) <sup>a</sup>	682 ± 12	756 ± 69	74 ± 9	121 ± 0,2
C(NI) <sup>b</sup>	634 ± 7 (31)	694 ± 6 (27)	65 ± 6 (3)	119 ± 0,1
D(I) <sup>a</sup>	656 ± 42	721 ± 79	82 ± 6	122 ± 0,1
D(NI) <sup>c</sup>	732	686	73	103

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)<sup>b</sup> : moyenne ± RPD % (n=2). Les écarts type sont dans les parenthèses.<sup>c</sup> : un réplicat<sup>d</sup> : bilan de masse = (As (V) + As(III) back-wash)\*100/As total mesuré)



Tableau D6 Concentrations totales de Cr et de Cu (mg/kg sol sec) des extraits aqueux en fonction du temps

Sol	Cr					Cu			
	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40	Jour 1	Jour 5	Jour 15	Jour 40	
A(I) <sup>a</sup>	27 ± 1	24 ± 1,4	16,6 ± 1,3	9 ± 1,2	0,2 ± 26 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	
A(NI) <sup>b</sup>	28 ± 7	22,5 ± 4	17 ± 2	7,7 ± 20	0,3 ± 78	0,4 ± 22	0,4 ± 5,4	0,4 ± 21	
B(I) <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,07	0,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2	3,6 ± 0,8	2,9 ± 0,0	1,9 ± 0,2	2,2 ± 0,3	
B(NI) <sup>b</sup>	0,4 ± 10	0,5 ± 33	0,4	1,5 ± 94	3,4 ± 20	3,7 ± 5,8	3,38	1,5 ± 43,1	
C(I) <sup>a</sup>	2 ± 0,1	n.d	n.d	1,9 ± 0,3	4,2 ± 0,1	n.d	n.d	3,4 ± 0,2	
C(NI) <sup>b</sup>	1 ± 9	n.d	n.d	1,5 ± 82	3,8 ± 0,1	n.d	n.d	2,7 ± 36	
D(I) <sup>a</sup>	1,6 ± 0,1	n.d	n.d	5,8 ± 0,2	7,1 ± 0,4	n.d	n.d	7 ± 0,0	
D(NI) <sup>c</sup>	1,5	n.d	n.d	14,9	6,3	n.d	n.d	17,8	

<sup>a</sup> : moyenne ± écart type (n=3)<sup>b</sup> : moyenne ± RPD % (n=2)<sup>c</sup> : un réplicat

n.d : non-déterminé